

**FABRÍCIO MESQUITA TUJI**

***AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DO  
SELENITO DE SÓDIO EM GLÂNDULAS  
PARÓTIDAS DE RATOS***

**Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para a obtenção do Título de Doutor  
em Radiologia Odontológica.**

**Piracicaba – SP  
- 2004 -**



**FABRÍCIO MESQUITA TUJI**

***AVALIAÇÃO DO EFEITO RADIOPROTETOR DO  
SELENITO DE SÓDIO EM GLÂNDULAS  
PARÓTIDAS DE RATOS***

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Radiologia Odontológica

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Pereira Barros

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marlene Fenyo Soeiro de Matos Pereira

Prof. Mari Ely Leoneli de Moraes

Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Prof. Dr. Francisco Haiter Neto

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida

Piracicaba – SP

- 2004 -

### Ficha Catalográfica

T819a	<p>Tuji, Fabrício Mesquita.</p> <p>Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos. / Fabrício Mesquita Tuji. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.</p> <p>xi, 73f. : il.</p> <p>Orientadores : Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria de Almeida, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Pereira Barros.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Radiobiologia. 2. Radiação ionizante. 3. Glândulas salivares. I. Almeida, Solange Maria de. II. Barros, Silvana Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



Dedico este trabalho a **Deus**, que com toda a certeza esta cuidando bem do meu querido irmão **Alex Augusto Mesquita Tuji**, assim como ele foi cuidado por sua família, o qual dedico este trabalho.

À minha **Família** representada por meu **Pai**, minha **Mãe** e por meu **Irmão**, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

À minha **Namorada**, **Gyselle de Souza Ribeiro**, pela compreensão e apoio em todos os momentos difíceis que passei, estando ao meu lado em todos os principais desafios da minha vida.

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

Aos professores da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, os quais estas palavras serão pequenas para descrever tudo o que fizeram por mim. Entre eles estão:

Profª. Drª **Solange Maria de Almeida**, a qual tive a felicidade de tê-la como minha orientadora e amiga, me acolhendo em Piracicaba em todo o tempo de meu curso, acrescentando seus conhecimentos e amizade, e também pela sua competente orientação por este trabalho realizado. Agradeço, ainda, à confiança em que depositou em mim, me aceitando como seu orientado e seu amigo, cuidando de mim como um filho-irmão, no qual serei eternamente grato.

**Sô**, gostaria que você soubesse que minha vida se divide em duas fases, tanto no lado profissional como no pessoal, são elas: Antes de Solange Almeida e depois de Solange Almeida. Obrigado por tudo, especialmente pelo carinho que você me deu nestes anos de convivência.

Prof. Dr **Frab Norberto Bóscolo**, o **PAI** da Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por transmitir a todos os seus alunos o caminho da competência e do sucesso, incentivando e mostrando para todos aqueles que tem o privilégio de estar ao seu lado como se faz pesquisa e como ser um excelente professor.

Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, pelos conhecimentos transmitidos ao longo deste curso, sempre incentivando seus alunos a buscarem novos desafios, proporcionando-nos uma dedicação ilimitada para alcançarmos o caminho do sucesso. Agradeço também a amizade e a confiança em mim, demonstrado pelo carinho que recebi de sua família, entre eles, sua esposa e seus filhos.

Profª Drª da Disciplina de Histologia, minha Co-orientadora, **Silvana Pereira Barros**, pela atenção dispensada e pela confiança no meu aceite como seu orientado, transmitindo valiosos conhecimentos no qual me eram distantes, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho, desde a escolha do tema à sua conclusão. Obrigado pelo carinho recebido e por sempre me ajudar nos momentos em que precisei.

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli, pela constante ajuda em todo o meu curso, sempre disposto a ensinar e que, com seu grande aprendizado e sua experiência, mostrou-me os caminhos da pesquisa, o qual tentarei aplicar da melhor maneira possível na minha longa jornada daqui para frente.

*Minha Eterna Gratidão*

## *AGRADECIMENTOS*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, representado pelo Professores Doutores **Thales Rocha de Mattos Filho e Oslei Paes de Almeida**, sendo respectivamente o Diretor e o Diretor Associado desta instituição, por ter me acolhido e oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados em suas áreas, mostrando-me o caminho no qual seguirei daqui para frente;

Aos meus amigos de pós-graduação: **Flávio Ricardo Manzi, Élcio Carneiro, Melissa Damian, Ricardo Matheus, Cláudia Haiter, Luciane Farias de Araújo, Mariliani Chicarelli, José Osmar Vasconcelos, Ana Silvia Ganzerli, Flávio Luiz Viero, Rívea Inês Ferreira, Maria Luiza dos Anjos Pontual, Karina Lopes Devito, Mauro Martins, Lúcio Mitsuo Kurita, João Batista Sobrinho do Nascimento Neto, Andréa de Castro Dominguos, Andréa doa Anjos Pontual, Fábio Ribeiro Guedes, Flávia Maria de Moraes Ramos, Juliana Araújo Bittar**, que marcaram uma etapa indescritível e única em minha vida, os quais estarão sempre em minha lembrança e em meu coração. Agradeço ainda ao amigo que não mais pode estar presente, mais certamente estará torcendo por cada um de nós em cada dia de suas conclusões de teses (**Tasso Shusterschitz**);

Às amigas do laboratório de histologia, em especial **Eliene (Eli) e Cida (Cidinha)**, pela incessante ajuda e ensinamento na fase experimental deste trabalho, sem as quais não seria possível a realização do mesmo, e também pela contagiante alegria que as cerca tornando mais prazeroso a conclusão desta etapa;



Ao funcionário **Wanderlei Francisco Vieira**, pela incansável ajuda e carinho com os animais deste experimento e pelo brilhante trabalho desenvolvido no biotério desta instituição;

Aos funcionários da radiologia, **Raquel, Waldeck, Giselda**, pela ajuda e cooperação prestados dentro e fora deste departamento, o que engrandece ainda mais a disciplina de radiologia da FOP-UNICAMP;

À disciplina de **Histologia** da FOP- UNICAMP, por ceder gentilmente seu laboratório e seu microscópio, contribuindo para a realização da parte prática deste trabalho;

Aos **funcionários da biblioteca**, em especial a bibliotecária **Heloisa Maria Ceccotti**, por todo apoio fornecido quando necessário e pela normatização desta tese;

Ao físico **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédicas da UNICAMP, pela ajuda no processo de Irradiação dos animais utilizados nesta pesquisa;

A **todos** que diretamente ou indiretamente ajudaram para a realização deste trabalho, no qual seria impossível descrever somente nas páginas concedidas para agradecimentos;

À **Deus**, o qual nunca me abandonou e sempre iluminou os meus caminhos.

*“Andei...*

*por caminhos difíceis, eu sei.  
Mas olhando o chão sob meus pés,  
vejo a vida correr.*

*E assim, a cada passo que der,  
tentarei fazer o melhor que puder.*

*Aprendi...*

*não tanto quanto quis, mas vi que,  
conhecendo o universo ao meu redor,  
aprendo a me conhecer melhor;  
e assim escutarei o tempo que me ensinará  
a tomar a certa decisão a cada momento.*

*E partirei...*

*Em busca de muitos ideais,  
mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.  
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.  
Hoje é o ponto de chegada.  
Mas ao mesmo tempo o ponto de partida. ”*

*(Autor Desconhecido)*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
RESUMO .....	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO .....	7
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	9
3. PROPOSIÇÃO.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6. PRANCHAS.....	58
7. CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bw	-	por peso corpóreo
µg	-	micrograma
ng	-	nanograma
µg/ml	-	Micrograma por mililitro
µM	-	micromolar
µm	-	micrômetro
cGy	-	centigray
Co		Cobalto
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DRF	-	Fator de redução da dose
GSH-Px	-	Glutathione peroxidase
Gy	-	Gray
ip	-	intraperitoneal
J/m <sup>2</sup>	-	Joule/metro quadrado
kg	-	kilograma
kVp	-	quilovoltagem/pico
mA	-	miliamperagem
MeV	-	Milhão de elétron volt
Nm	-	nanômetro
nM	-	nanomolar
pH	-	Potencial hidrogeniônico

*Avaliação do Efeito Radioprotetor do Selenito de Sódio em Glândulas Parótidas de Ratos.*

---

ppm	-	Dose por milhão
R	-	Roentgen
rad	-	Radiation absorbed dose
sc	-	Subcutâneo
UI	-	Unidade internacional
UV	-	ultravioleta

## RESUMO

A finalidade deste trabalho foi avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio em glândulas parótidas de ratos, através da análise ultra-estrutural das células acinares. Para tanto, utilizou-se uma amostra constituída de 57 ratos, que foi dividida em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, selênio e selênio/irradiado. Os animais pertencentes aos grupos irradiado e selênio/irradiado foram submetidos a 15 Gy de radiação gama em dose única, na região de cabeça e pescoço; os animais pertencentes aos grupos selênio e selênio/irradiado receberam uma dose de 0,5 mg de selenito de sódio, intraperitonealmente, tendo-se como momento da injeção do selênio, o período de 24 horas antes do grupo selênio/irradiado sofrer a irradiação. No grupo controle, injetou-se a mesma quantidade de selenito de sódio. Após 4, 8, 12, 48 e 72 horas da irradiação, todos os animais foram sacrificados e a ação radioprotetora do selênio foi avaliada através da análise ultra-estrutural das células acinares das glândulas parótidas. Os resultados obtidos indicaram que a radiação causou alterações celulares a partir do grupo 4 horas, sendo que as organelas que apresentaram maiores alterações foram as mitocôndrias e os grânulos de secreção, observando-se também alterações nucleares. O início do processo de reparo no tecido glandular deu-se 24 horas após a irradiação, observando-se uma melhor organização com 48 e 72 horas. Entretanto, a reparação ainda não se mostrava completa neste último tempo

avaliado. Diante dos resultados, o selenito de sódio teve ação radioprotetora, visto que o grupo selênio/irradiado apresentou menos danos em relação ao grupo irradiado sem a substância avaliada, o que resultou em uma reparação tecidual mais cedo. Contudo, observou-se que o selenito de sódio causou alterações celulares, sendo evidentes a partir da oitava hora, porém com menor dano em relação àquele causado pela radiação, o que demonstra um risco-benefício favorável ao seu uso como radioprotetor.

## **ABSTRACT**

**T**he propose of the present study was to evaluate the radioprotective action of Sodium Selenite through the ultra structural analysis of the acinares cells of parotid glands of rats. 57 wistar rats were exposed to 15 Gy of Gamma radiation, simulating the radiotherapy procedure used in treatment of solid tumors of the head and neck. They were divided into four groups: Control; Irradiated, where they were submitted to a single dose of 15 Gy Gamma radiation a single dose; Irradiated Selenite, in which it was administered the Selenite 24 hours before exposure to the radiation and; Selenium, in which it 0,5mg of Sodium Selenite was administered. After 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours of the radiation, the animals were sacrificed and the radioprotective effect of Selenium was evaluated through the ultra structural analysis of the acinares cells of the parotids glands. The results showed that the radiation induced cellular injury from the first analyzed group (4 hours) and the intracytoplasmic organelles more damaged were the mitochondrias and the secretion granules, being also observed nuclear alterations. The beginning of the repair process was observed 24 hours after the irradiation, there being an improvement of the cellular organization at the other analyzed times. However, it was not observed the complete repair process even in the last appraised group. The results showed that sodium selenite is an effective radioprotector, because all the analyzed groups presented an increase in



the tissue repair in relation to the group without protection. However, it was observed that the sodium selenite induced cellular injury, starting from the eighth hour group, but the cellular damage was very small in relation to the irradiated group, what demonstrates a favorable risk-benefit in its use as a radioprotector.

## 1. INTRODUÇÃO

A radioterapia de tumores de cabeça e pescoço pode provocar sérios prejuízos e debilidades das estruturas presentes na área de atuação da radiação.

Dentre os órgãos injuriados pela ação das radiações ionizantes, quando da radioterapia de cabeça e pescoço, encontram-se as glândulas salivares, sendo que as alterações causadas a estas estruturas também são dependentes do volume de tecido irradiado e da dose de radiação.

Como danos pós-irradiação das glândulas salivares, observam-se mudanças funcionais e estruturais, como diminuição no volume e alteração na composição da saliva, desconforto oral noturno, xerostomia e alta suscetibilidade para infecções dentárias, diminuindo consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes.

Estudos histológicos de glândulas salivares irradiadas (SHOLLEY *et al.*, 1974; VISSINK *et al.*, 1991), revelam que as células acinares são as mais sensíveis à radiação, apresentando uma inibição na replicação destas células, hipofunção e finalmente morte celular uma a duas horas após a irradiação.

Dentre as glândulas salivares maiores, a glândula parótida é a mais sensível, enquanto que as glândulas submandibulares e sublinguais são relativamente radorresistentes, o que pode estar relacionado com a grande quantidade de células serosas distribuídas nas glândulas parótidas (COPPES *et al.*, 2002; PETER *et al.*, 1994a).

Um dos fatores que contribuem para os danos provocados pela radiação é o fato de que no exato momento em que a radiação ionizante é absorvida pelos tecidos vivos, ocorrem nas células reações químicas com produção de radicais livres que provocam danos ao DNA de células normais.

Sabendo-se disto, tem-se pesquisado substâncias que diminuam os efeitos deletérios provocados pela exposição às radiações ionizantes, substâncias estas conhecidas como Radioprotetores (CARROL *et al.*, 1995), que são utilizados principalmente quando a radiação ionizante é administrada com finalidade terapêutica em pacientes portadores de certos tipos de cânceres.

Os radioprotetores têm a propriedade de proteger o tecido sadio ou pelo menos diminuir os danos a eles causados pela radiação. Seu mecanismo de ação ainda não está claro, porém autores como BOREK, (1993) e SPYROU *et al.*, (1995), citam que sua ação é decorrente de ligações químicas realizadas entre certas enzimas que são ativadas por estas substâncias e os radicais livres produzidos pela radiação.

Visto que a ação dos antioxidantes, em especial do selênio, está diretamente ligada à captura de radicais livres, formados a partir da interação entre radiações ionizantes e o tecido vivo, funcionando, portanto, como um radioprotetor, a realização do presente estudo é justificada pela necessidade de pesquisar-se substâncias que minimizem os efeitos deletérios das radiações ionizantes nos tecidos sadios circunjacentes à área irradiada, contribuindo desta forma, para amenizar as seqüelas decorrentes da irradiação de pacientes que tenham como modalidade terapêutica à radioterapia.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

**P**ara um melhor entendimento e compreensão do assunto a ser abordado e discussão dos resultados obtidos, dividiremos a revisão da literatura em tópicos que abordarão as alterações nas glândulas salivares ocasionados pela radiação, o uso de radioprotetores e o metabolismo da substância a ser pesquisada.

### ***2.1- Efeitos da radiação nas glândulas salivares:***

**O** tratamento de tumores da região de cabeça e pescoço por meio da radioterapia causa uma série de efeitos adversos em decorrência da irradiação de estruturas adjacentes a esta região, como as glândulas salivares. Complicações como a xerostomia, mucosites, osteorradionecrose, perda do paladar, disfagia e cáries dentais, são alguns dos efeitos colaterais decorrentes das alterações na estrutura e função das glândulas salivares provocados, na maioria das vezes, em decorrência da diminuição do fluxo salivar (COPPES *et al.*, 2002).

Sendo assim, em 1972, PRATT & SODICOFF, realizaram um estudo em relação à injúria das células acinares das glândulas parótidas de ratos quando

submetidas à irradiação. Após o uso de 1600 rad de radiação X na região de cabeça e pescoço, as alterações ultra-estruturais nas células acinares das glândulas foram avaliadas nos períodos de 1, 3 e 5 horas e 1, 2, 3, 4, 7 e 8 dias. Os danos foram evidentes a partir da 3<sup>a</sup> hora, com um máximo de destruição verificada no 2<sup>o</sup> dia. A alteração ultra-estrutural mais evidente foi a formação de “corpos citolíticos”, que representam danos nas organelas celulares, sendo mais comum no retículo endoplasmático, mitocôndrias e células secretoras. Após o 7.<sup>o</sup> e 8.<sup>o</sup> dias, a alteração mais evidente foi a presença de vacúolos vazios. Como conclusão, os autores observaram que as mudanças encontradas nas células acinares foram verificadas precocemente, mesmo utilizando uma dose baixa de 1600 rad.

Em 1974, SHOLLEY *et al.*, realizaram uma avaliação ultra-estrutural das injúrias agudas nas células acinares e no endotélio vascular de glândulas parótidas causadas pela radiação. O endotélio vascular foi avaliado com o intuito de descartar a possibilidade de que injúrias parenquimais nesta glândula fossem secundárias às injúrias microvasculares após a irradiação, como observada em órgãos como o intestino, cérebro e coração. Para isto, ratos foram submetidos a exposições únicas de 1600R e de 6400 R de radiação X, sendo posteriormente sacrificados em tempos pré-determinados: 0-6 e 18 horas, 1, 2, 3, 5, 6 e 8 dias para a avaliação ultra-estrutural das células acinares; enquanto que para a avaliação do endotélio, os animais foram submetidos a 6400 R e sacrificados nos tempos de 0-6 e 18 horas, 1, 2, 3, 4, 6 e 8 dias. Os danos nas células acinares foram similares nas duas exposições, sendo observadas degeneração citoplasmática e necrose celular (corpo citolítico e corpo claro), sendo com maior intensidade no grupo exposto a 6400 R. O “**corpo citolítico**” é explicado como sendo uma degeneração citoplasmática contendo fragmentos de retículo endoplasmático granular, mitocôndrias, grânulos de secreção e material denso amorfo, podendo ser envolvido parcial ou totalmente por uma membrana. Devido a sua pequena dimensão, esta estrutura não é freqüentemente visualizada na microscopia de luz. O “**corpo claro**”, que é caracterizado pela presença de fragmentos citoplasmáticos das células acinares, mais claros que o usual, contendo ribossomos livres, fragmentos nucleares, retículo endoplasmático

granular e grânulos de secreção. Os danos nas células acinares foram semelhantes nas duas exposições até o 2º dia, onde se observaram as maiores alterações. A partir do 3º dia os grupos de 1600 R e 6400 R apresentaram regressão nas alterações até a aparência normal no 8º dia para o grupo de 1600 R, enquanto que o grupo de 6400 R ainda apresentava algumas alterações. Também foi observada a presença de macrófagos e células mononucleares em todos os períodos, enquanto que neutrófilos eram raramente observados. Quanto a avaliação do endotélio vascular, não foram observadas alterações em nenhum dos grupos analisados, demonstrando que a radiação não alterou a microvasculatura da glândula parótida, descartando a possibilidade das alterações nas células acinares serem de origem vascular.

As alterações ultra-estruturais nas glândulas parótidas e submandibulares também foram avaliadas por STERN *et al.*, em 1976. Para isto, foi realizado um estudo com ratos após a irradiação no corpo todo por feixes de nêutrons com uma dose de 200 rads. Os animais foram sacrificados após 3, 5 horas e 1, 4 e 7 dias, sendo removidas as glândulas submandibular e parótida, bilateralmente. Como resultados foram observadas alterações nas glândulas parótidas, em todos os tempos avaliados, com destruição citoplasmática que variavam de configuração com o decorrer do tempo. As células acinares apresentaram-se em aglomerados dispersos, com presença de áreas de degeneração de organelas citoplasmáticas, como o retículo endoplasmático granular. Foram observados ainda a presença de estruturas delimitadas por membrana contendo retículo endoplasmático granular, grânulos de secreção, fragmentos de mitocôndrias, materiais amorfos e fragmentos de organelas pleomórficos. Alguma destas estruturas de maior dimensão apresentava fragmentos nucleares como heterocromatina e eucromatina. As maiorias destas alterações foram observadas nas porções basais das células, atingindo a sua maior alteração no 4º dia, e regredindo a partir do 7º dia. Estruturas como os linfócitos, células plasmáticas e vasos não se apresentaram alterados.

Visto que a radiação ionizante determina alterações estruturais significativas nas células acinares que, conseqüentemente, refletem em alterações

na fisiologia normal das glândulas, ANDERSON; IZUTSU & RICE (1981), avaliaram a patofisiologia da glândula parótida de pacientes com câncer que foram submetidos a tratamento por radioterapia. Foram avaliados cinco pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço, submetidos à radiação mista de Gama e Nêutrons, onde foram coletadas amostras de saliva da glândula parótida antes do tratamento até a sua completa ausência após o tratamento. Foi verificado que a radiação reduziu consideravelmente o fluxo salivar, sendo esta redução uma conseqüência da destruição das células acinares. O pH também apresentou um decréscimo, com uma redução da concentração do íon bicarbonato, devido à mudança no fluxo salivar ocasionada pela radiação. As proteínas estudadas não apresentaram alterações, não sendo verificadas também, alterações na concentração da amilase; já na concentração do sódio e do cloreto, ambos apresentaram um significativo aumento na fase inicial do tratamento, porém com a progressão do tratamento a concentração destas substâncias foi reduzida.

A avaliação ultra-estrutural da influência da radiação X nas células dos ductos estriados de glândulas submandibulares foi realizada por MESSELT & DAHL, em 1983. Foram utilizados ratos que receberam doses únicas de 200, 750 ou 1800 rad, e após 24 horas foram sacrificados e avaliados por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que no grupo de 200 rad, as células do ducto estriado desenvolveram vesículas apicais em grandes números, que variavam de forma, mas com densidade eletrônica semelhante ao normal. No grupo de 750 rad, as membranas das células dos ductos apresentaram microvilosidades, porém sem sinais de vesículas apicais, enquanto que o número de mitocôndrias apresentava-se reduzido. Nas células dos ductos expostos a 1800 rad, o número de mitocôndria mostrou-se aumentado, ocupando a maioria do citoplasma, enquanto que o lúmen do ducto apresentava-se reduzido em tamanho e estava freqüentemente obstruído por estruturas insufladas e elétron-densas. O núcleo mostrou extenso pleomorfismo em relação ao tamanho e a densidade eletrônica. Como conclusão estes autores afirmaram que as vesículas encontradas nos grupos irradiados são semelhantes às encontradas nas glândulas controles, sendo uma condição normal, que é destruída quando o tecido é exposto à altas doses de radiação X.

A avaliação das células dos túbulos convolutos granulares de glândulas submandibulares, após a irradiação, foi realizada por READE & STEIDLER, em 1985. Foram utilizados ratos submetidos à 400 e à 800 rads de radiação X, dos quais posteriormente foram removidas as glândulas submandibulares, nos tempos de 1 hora, 1, 2, 6, 10, 14, 22, 32, 43, 76 e 100 dias e avaliados por meio da imunohistoquímica e da microscopia eletrônica de transmissão. Foi observado que nos grupos submetidos à 400 rads, as mudanças eram discretas e inconsistentes, porém apresentavam-se direcionadas para as alterações do grupo submetido à 800 rads. A alteração verificada nas células dos túbulos convolutos granulares do grupo de 800 rads foi uma progressiva degranulação até o 2º dia, sendo verificada a total regeneração no grupo de 76 dias após a irradiação. No exame de imunofluorescência, a degranulação foi acompanhada por uma perda de imunoreatividade epidermal do fator de crescimento, que era aumentada progressivamente com a regeneração tecidual, sendo verificada a sua aparência normal no grupo de 76 dias após a irradiação. Foram realizados também a aplicação de um bloqueador adrenérgico ( $\alpha$ -adrenérgico) – Hidroclorito de fentolamina, nos animais previamente expostos à 800 rads de radiação X, sendo os mesmos sacrificados nos tempos de 1, 6, 12 horas e 1, 2, 4, e 6 dias após a irradiação. Nos grupos tratados com a Fentolamina, uma menor degranulação foi observada nas células dos túbulos convolutos, sendo uma quantidade de grânulos 10 vezes maior em relação aos grupos não tratados com fentolamina. Com isto, os autores concluíram que a degranulação não parece ser um efeito direto da radiação, mas um efeito que a radiação produz suprimindo a estimulação do nervo  $\alpha$ -adrenérgico que leva ao processo de degranulação.

A rápida morte das células de glândulas parótidas, imediatamente após a irradiação é definida como “interfase de morte celular”, segundo STEPHENS *et al.* em 1989, sendo o mecanismo desconhecido. Estes mesmos autores avaliaram os efeitos da radiação nas células da glândula parótida, por meio de culturas de células de macacos com baixa concentração de Isoproterenol irradiados por  $^{60}\text{Co}$  em doses de 0 a 15 Gy. Após 24 horas foi possível verificar que as células apresentavam um acúmulo ou perda de grânulos de secreção, presença de eosinófilo no citoplasma e hipercromasia nuclear, caracterizada por condensação



da cromatina. A contagem das alterações nucleares foi utilizada para determinar a quantificação da injúria da radiação, apresentando-se de diversas formas (aberrações nucleares), incluindo aglomerados (pcnóticos), fragmentados e marginados (polarização crescente). Foi verificada uma discreta desorganização com perda da homogeneidade das células acinares e também que quanto maior a dose maiores foram as alterações nucleares, sendo evidentes em todas as doses analisadas. Pode ser observado também que nas culturas celulares em que foi administrado Isoproterenol, estas apresentaram uma menor injúria, sendo evidente na dose de 5 Gy.

Neste mesmo ano, ROSLINDO *et al.*, realizaram um estudo histomorfológico da glândula parótida de ratos submetidos à radiação ionizante. Para isto, foram utilizados ratos jovens, com 25 dias de idade, que foram submetidos à cirurgia prévia para a exposição das glândulas salivares, que receberam 300 R, em um intervalo de tempo de 48 horas, totalizando uma exposição de 1200 R. Decorridos o período de 3, 8, 13, 18 e 28 dias, os animais foram pesados e sacrificados para a remoção das glândulas parótidas sendo confeccionadas lâminas histológicas para a microscopia de luz. Como resultados, foi observado que os animais irradiados perderam peso corpóreo desde o primeiro grupo de sacrifício, vindo a ganhar peso corporal somente a partir do 13 dias de sacrifício, não sendo equivalente aos grupos controles. Pela análise histomorfológica, a fase crítica de desorganização celular correspondeu ao período de 08 dias, decrescendo progressivamente nos seguintes, sendo os ácinos serosos e os ductos estriados as estruturas com maior radiosensibilidade.

Em 1991, o efeito agudo da radiação na morfologia e função das glândulas submandibulares, foi avaliado por VISSINK *et al.* Ratos adultos foram submetidos a 15 Gy de radiação X aplicados na região da glândula submandibular. Nos períodos de 4 dias antes e 1, 3, 6 e 10 dias após a irradiação a saliva da glândula submandibular foi coletada e, posteriormente, as glândulas foram removidas para a realização de lâminas para a microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Como resultados, foi observado que a radiação causou severas alterações morfológicas e funcionais na glândula submandibular, tendo como principais

alterações morfológicas a perda de granulação nos túbulos granulares, condensação nos grânulos mucosos, destruição de mitocôndrias e distensão das membranas nucleares e da cisterna do retículo endoplasmático. Como conclusão, os autores observaram que as mudanças funcionais ocorrem antes da maioria das alterações morfológicas serem detectadas e que as alterações funcionais persistem mesmo após a normalidade morfológica.

Os efeitos agudos decorrentes da irradiação consistem de alterações histológicas como degeneração das células serosas, necroses, perda focal das células acinares e inflamações agudas que são observadas durante as primeiras 24 horas em humanos. Além disto, as alterações funcionais também tem sido alvo de diversos estudos, como o de NAGLER, BAUM & FOX, em 1993, em que avaliaram funcionalmente as glândulas parótida e submandibulares durante as primeiras 24 horas após a irradiação única de 15 Gy de radiação X, na região de cabeça e pescoço de ratos. O fluxo salivar foi medido para a parótida e submandibular nos tempos de 0,5, 1, 4 e 24 horas após a irradiação, sendo observado que não houve alterações significantes no fluxo salivar em nenhum dos tempos na glândula submandibular, enquanto que na glândula parótida nos tempos de 0,5 a 4 horas, houve uma redução de aproximadamente 42% até as 4 horas. Em relação ao peso glandular, após 1 hora já havia diferença entre o grupo irradiado e controle e após 24 horas a diferença de peso apresentava-se significativa, em aproximadamente 23% a menos para o grupo irradiado. Na composição da saliva, não houve diferença na concentração de proteínas, porém o nível de sódio na saliva do grupo irradiado apresentou-se significativamente menor que o do grupo controle até as 24 horas.

A avaliação da proliferação celular em glândulas parótidas e submandibulares após a exposição à radiação foi verificada por PETER *et al.* (1994a). Para isto, ratos foram expostos a uma dose única de 15 Gy de radiação X, somente na região das glândulas salivares. Imediatamente, 10 horas, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 30 dias após a irradiação, as glândulas foram removidas e demarcadas com um identificador de síntese de DNA (BrdU). Como resultados, os autores verificaram um decréscimo na atividade celular nos ácinos, nos túbulos

convolutos granulares e nos ductos intercalares, quase que imediatamente após a irradiação, com danos no ciclo normal da célula e conseqüente morte celular. Posteriormente, um aumento na proliferação celular foi verificado primeiramente nos ductos intercalares, atingindo níveis semelhantes ao controle no décimo dia após a irradiação. Estes autores ainda concluíram que a atividade proliferativa da glândula parótida é maior em relação à glândula submandibular, em decorrência de sua maior radiosensibilidade, o que permite uma maior destruição celular e conseqüente repopulação tecidual.

Estes mesmos autores (1994b), realizaram um estudo morfológico das células acinares das glândulas salivares de ratos em relação à radiosensibilidade. Foi utilizado uma dose única com intensidade de 15 Gy de radiação X, tendo como finalidade provocar mudanças morfológicas nas glândulas parótidas e submandibulares. Essas alterações foram observadas desde o primeiro dia, com a presença de degranulação das células serosas e a indução de aberrações nucleares nas células mucosas e serosas, sendo que a re-constituição da integridade do tecido foi observado somente após o 6º dia.

NAGLER *et al.*, em 1996, pesquisaram o efeito da radiação X nas funções das glândulas salivares maiores durante duas semanas. Para isso, estes autores utilizaram ratos, medindo o peso corporal destes animais e a função salivar das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais em grupos de 4, 8, 11 e 14 dias após a irradiação de 15 Gy, em dose única, de raios X. Dentro do grupo dos animais que não foram irradiados, um subgrupo ingeriu somente a quantidade de água e alimento que foi ingerido pelo grupo irradiado, sendo denominado de grupo simulado. Como resultados, estes autores encontraram que quanto ao peso corporal, os animais irradiados apresentaram um decréscimo nos grupos de 4 a 11 dias, não havendo diferença significativa entre o grupo irradiado e o grupo simulado, que aos 14 dias retornaram ao peso que tinham 4 dias pós irradiação, sendo aproximadamente 30% menor que dos animais do grupo controle. Quanto a função das glândulas parótidas, houve uma significativa redução na função salivar aos 4, 8 e 11 dias no grupo irradiado com relação ao grupo controle, sendo semelhante ao grupo simulado, retornando a sua função normal aos 14 dias. Em

relação às glândulas submandibulares e sublinguais, foi verificado que a função não mostrou-se alterada em nenhum dos grupos, sendo semelhante ao grupo controle, mostrando que essas glândulas são relativamente resistentes à radiação e a restrição de dieta utilizada. Os autores concluem que as alterações produzidas pela radiação, quando utilizada a dose de 15 Gy, são reversíveis, e que as alterações na função secretora das glândulas parótidas não estão diretamente ligadas aos danos produzidos pela irradiação, mas sim pela inanição resultante da síndrome orofaríngea, que é induzida pela exposição da região de cabeça e pescoço em radioterapia.

Em 1997, GREHN *et al.*, realizaram a morfometria ultra-estrutural de células acinares de glândulas parótidas de ratos expostos à doses fracionadas de radiação utilizando um acelerador linear (6 MV). Os animais foram expostos a doses diárias de 6 ou 8 Gy por cinco dias consecutivos, totalizando uma dose de 30 ou 40 Gy, unilateralmente, sendo o lado oposto protegido com uma lâmina de chumbo para servir de controle. Após 180 dias os animais foram sacrificados e realizados os cortes para a morfometria e para a análise ultra-estrutural. Na análise morfológica, não foram evidenciadas células inflamatórias, porém uma desigual distribuição dos ácinos mais próximos aos grandes vasos, foi detectada no grupo de 30 Gy. No grupo de 40 Gy, uma grande perda dos ácinos foi observada, sendo que os ácinos remanescentes apresentavam-se desorganizados e sempre maiores que o normal. Na análise quantitativa foi verificado que no grupo exposto a 30 Gy, havia uma discreta redução das células acinares, mas não significativa, ao contrário do grupo de 40 Gy que apresentou uma perda significativa de células acinares, com um decréscimo de 50 % de densidade acinar em relação ao grupo de 30 Gy. Nas avaliações ultra-estruturais, não foram verificadas diferenças celulares e nucleares entre os grupos irradiados e não irradiados do mesmo animal. Como conclusão estes autores observaram que houve diferença entre as diferentes doses, porém não entre as glândulas irradiadas e não irradiadas.

NAGLER *et al.*, em 1997, observando que o mecanismo que ocasiona a hipofunção das glândulas salivares em decorrência da irradiação ainda não estava

bem esclarecido, avaliaram os danos ocasionados pela radiação com o mecanismo de oxi-redução do cobre e do ferro, avaliando também a função radioprotetora de estimulantes salivares. Foram utilizados ratos irradiados (15 Gy de radiação X) na região de cabeça e pescoço, nos quais foi administrada, 90 minutos antes da irradiação, solução salina contendo pilocarpina e/ou ciclocitidina. Após dois meses a função das glândulas submandibular e parótida foi avaliada, sendo também realizada uma avaliação ultra-estrutural do tecido glandular, além de uma avaliação da quantidade de ferro e cobre por meio da espectrofotometria por absorção atômica. Como resultados, foi observada uma marcante perda de função das glândulas salivares, sendo que o tratamento com a ciclocitidina apresentou um efeito radioprotetor somente na glândula parótida, enquanto que a pilocarpina não apresentou efeitos protetores significantes em nenhuma das glândulas. Na avaliação ultra-estrutural da glândula parótida, o tratamento com ciclocitidina e de cliclocitidina/pilocarpina determinou uma completa degranulação das células serosas, enquanto que a pilocarpina administrada isoladamente causou apenas uma degranulação marginal. Na glândula submandibular, não foi observada diferença nas células mucosas entre os grupos nos quais foram administradas pilocarpina e/ou ciclocitidina em relação ao controle. Quanto à composição da saliva, na glândula parótida foi observada uma grande quantidade de ferro e cobre, enquanto que na saliva da glândula submandibular não foi detectado nenhum metal. A saliva da glândula parótida após estimulação com pilocarpina apresentou um alto nível de metal com oxi-redução, ao contrário da saliva da glândula submandibular, levando a concluir que a radioproteção exercida na glândula parótida pela oxi-redução do cobre e do ferro, parece ser em decorrência da secreção destes metais para fora das células da glândula parótida, provocada por uma degranulação.

A atrofia das glândulas salivares é observada pós-irradiação, sialodenites e na síndrome de Sjögrens. Um bom entendimento no processo de atrofia e regeneração destas glândulas pode permitir estratégias para a radioproteção das mesmas ou métodos para o tratamento dos efeitos adversos. Por isso, BURGESS & DARDICK, em 1998, avaliaram as mudanças celulares que ocorrem durante a atrofia e regeneração de glândulas parótidas de ratos. No 5º dia de obstrução da

glândula parótida, a maioria das mudanças ocorreu devido à perda das células acinares, sendo que esta perda tornou-se evidente após o segundo dia de obstrução, com redução de sua dimensão, principalmente no 10<sup>o</sup> dia. Após a desobstrução da parótida, o aumento das células acinares ocorreu a partir das primeiras 24 horas, sendo que sua recuperação total ocorreu no 14<sup>o</sup> dia, sendo observada uma aparência semelhante ao grupo controle. Na avaliação morfométrica, os autores verificaram que durante a atrofia, as maiores reduções ocorreram na área das células dos ductos intercalares em relação à área das células mioepiteliais e das células dos ductos estriados, porém nos demais tempos analisados, as células mioepiteliais apresentaram-se mais susceptíveis a alterações.

Recentemente, em 2002, a radiosensibilidade entre as glândulas parótidas e submandibulares foi comparada por COPPES; VISSINK & KONINGS. Estes autores citam que as células serosas apresentam mais danos como degranulação, atrofia e picnoses à baixas doses de radiação em relação às células mucosas e ductais, por isso, devido a glândula parótida apresentar-se composta principalmente de células serosas, enquanto que as submandibulares são compostas de células serosas e mucosas (mista), a glândula parótida pode ser mais radiosensível em relação à produção de saliva. Foram utilizados ratos que foram expostos a uma dose simples de 15 Gy e à doses fracionadas de 2 Gy totalizando 32 Gy. A salivagem natural foi coletada 30 minutos após a irradiação, enquanto que a salivagem induzida por pilocarpina foi coletada antes da irradiação, 1, 3, 6, 10, 22, 30, 38, 60, 120, 180 e 240 horas após a irradiação. Uma semana após a coleta da saliva, as glândulas foram removidas sendo confeccionadas lâminas histológicas para a análise na microscopia de luz. Como resultados foi observado que a salivagem espontânea apresentou-se inalterada. Porém, nos primeiros 10 dias, um rápido declínio no fluxo salivar foi verificado em ambas as glândulas. Na glândula submandibular não houve diferença no fluxo salivar entre a dose simples e a dose fracionada. Surpreendentemente, na glândula parótida o fluxo salivar foi menos afetado pela radiação fracionada, levando a conclusão que para doses fracionadas a glândula submandibular apresenta-se mais radiosensível que a glândula parótida. Segundo os autores, Isto pode ser devido

à menor capacidade regenerativa das células acinares dos ductos intercalares da glândula submandibular. Com relação a patohistologia, foi observado que o peso glandular apresentou uma redução de 50 % em ambas as glândulas e um aumento nas células ductais, tecido fibroso e células do tecido de granulação, além do que as células acinares apresentaram-se em menor número, com menor grau de granulação e formatos irregulares.

## **2.2 – Mecanismos da ação antioxidante do selênio:**

**T**APEEL, em 1965, verificou que o mecanismo de ação antioxidante do selênio é semelhante ao dos radicais sulfurados, porém com uma superioridade em relação aos mesmos, sendo classificado em: a) antioxidante lipídico que inibe a peroxidação; b) decomposição do peróxido; c) captura dos radicais livres; d) reparo dos danos moleculares.

Em 1972, ROTRUCK *et al.* realizaram um experimento com a finalidade de verificar a possível relação do selênio com a enzima glutathione peroxidase. Ratos foram submetidos a dietas com deficiência de selênio e dietas com 0,5 ppm de selênio, na forma de selenito de sódio, estando todas as dietas acrescidas de 50 mg de alfa-tocoferol por kilograma de dieta. Como resultado foi observado que os animais do grupo com deficiência de selênio, apresentavam muito menos glutathione peroxidase do que o grupo da dieta com selênio. Isso possibilitou o início de uma suspeita de que o selênio poderia fazer parte da constituição da glutathione peroxidase, tornando-se alvo de várias pesquisas, pois era sabido de que o mecanismo primário desta enzima é a degradação, em baixos níveis, de peróxido de hidrogênio nas células, além de também agir nos hidroperóxidos de ácidos insaturados gordurosos, mostrando ser um importante protetor dos lipídios da membrana celular contra a desintegração a partir da oxidação.

Em 1973, FLOHE *et al.*, classificaram a enzima glutathione peroxidase como uma selenoenzima, pois verificaram que a deficiência de selênio levava a diminuição na atividade desta enzima, o que permitia considerar o selênio um componente essencial da glutathione peroxidase. Este achado pode, segundo os autores, explicar algumas manifestações patológicas que ocorrem com a deficiência do selênio que, normalmente, estão relacionadas com a peroxidação de lipídios insaturados em membranas biológicas.

Em 1974, o efeito do selênio na atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) foi verificado nos eritrócitos e no fígado de ratos por HAFEMAN *et al.*, que utilizaram uma dieta com selenito de sódio, onde foram feitos dois experimentos. No primeiro, foi utilizado o selênio em diversas concentrações (0; 0.05; 0.10; 0.5; 1 e 5 ppm), dividindo os animais em seis grupos. Os autores observaram que o selênio tinha uma grande influência na atividade da glutathione peroxidase apresentando, nos eritrócitos, sua maior atividade no grupo com 5 ppm de selenito de sódio, com uma média de 132% de acréscimo em relação ao nível inicial, enquanto que no fígado sua influência foi sempre mais pronunciada, com uma maior atividade no grupo com 1 ppm de selenito de sódio, contrariando os achados para os eritrócitos, podendo ser explicado, provavelmente, pelo dano hepático provocado pela toxicidade do selênio em grandes concentrações. No segundo experimento, foram utilizados ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio durante nove meses, sendo em seguida divididos em quatro grupos submetidos a uma dieta com diferentes concentrações de selenito de sódio (0, 0.1, 0.5 e 5 ppm). Foi observado que estes animais possuíam, previamente à administração do selênio, uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase ao nível dos eritrócitos e que, após a administração do selênio, o aumento da atividade enzimática foi maior no grupo com 5 ppm de selenito de sódio. Com esses resultados HAFEMAN *et al.* afirmaram que o selênio é essencial para a atividade da glutathione peroxidase.

No mesmo ano, CHOW *et al.* ressaltaram que a glutathione peroxidase é uma importante enzima, responsável pela desintoxicação da maioria dos peróxidos lipídios que podem ser formados no organismo protegendo, desta



maneira, os tecidos contra os efeitos deletérios dos mesmos. Também afirmaram que o selênio é parte integrante desta enzima, sendo utilizado para esse estudo ratos submetidos a dietas contendo selênio na forma de seleniometione, onde foram analisadas as atividades da glutathione peroxidase no plasma, rim, coração, pulmão, fígado e eritrócitos. Como resultado foi verificado que o grupo que possuía deficiência de selênio apresentava uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase em aproximadamente 53% no coração e 39% para os pulmões, sendo que o maior decréscimo foi verificado no plasma e o menor nas células vermelhas. Quando foi utilizada a dieta com selênio, foi observado que entre os tecidos estudados, o plasma mostrou a maior mudança na atividade da glutathione peroxidase, com um acréscimo de 419% em relação ao grupo da dieta com deficiência de selênio. Também foi verificado um aumento da atividade enzimática nos outros tecidos estudados. Com isso, os autores concluem que o selênio é extremamente necessário para a atividade da glutathione peroxidase, sendo mais eficaz no plasma, rim, coração, eritrócitos, pulmões e fígado, enquanto que com a diminuição do selênio a menor atividade enzimática foi encontrada no plasma, rim, coração, pulmão, fígado e eritrócitos. Sendo assim, devido o plasma ser o mais sensível na atividade enzimática em relação à dieta com o selênio, os autores ainda afirmam que é possível determinar o nível de selênio pela atividade da glutathione peroxidase no plasma.

LAWRENCE *et al.* em 1976, através de uma experiência com ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio, afirmaram que a atividade da enzima glutathione peroxidase está diretamente ligada a dieta com selênio, e que dietas com deficiência desta substância diminuíam a atividade desta enzima contra o peróxido de hidrogênio. Para isto, os animais foram divididos em dois grupos, um com uma dieta deficiente em selênio, e outro com adição de 0,5mg/kg de selenito de sódio. Foi verificado que a atividade da glutathione peroxidase em relação ao Peróxido de Hidrogênio teve um decréscimo, no grupo com deficiência de selênio, de 8% a 42% em relação ao grupo com administração de selênio.

SANDSTRÖN *et al.*, em 1989, avaliaram o aumento da atividade da glutathione peroxidase para a proteção das células humanas contra o peróxido de hidrogênio

através do selênio. A pesquisa foi feita com células humanas as quais foram tratadas com 100nM de selenito por 10 a 15 dias e expostas ao peróxido de hidrogênio por 30 a 60 minutos, o que permitiu concluir que estas células sofreram um aumento considerável no nível da atividade da glutathione peroxidase, porém os autores relatam que mesmo com o aumento desta enzima, ela foi incapaz de proteger o DNA da ação das radiações ionizantes, agindo apenas na prevenção da lise celular provocada pelo peróxido de hidrogênio que não destrói o DNA.

### **2.3 – Mecanismo da ação radioprotetora do selênio:**

**C**omo visto anteriormente, a enzima glutathione peroxidase é considerada uma selenoenzima, atuando diretamente na captura de radicais livres provocados pela radiação. Assim, serão abordadas as substâncias a base de selênio, para que se tenha um bom entendimento do mecanismo de radioproteção destas substâncias, em especial o selenito de sódio.

Estudo de químicos radioprotetores *in vivo* e *in vitro* tem levado a um melhor entendimento dos danos que a radiação produz, assim como a aplicação prática destas substâncias. Sendo assim, o primeiro estudo que obteve sucesso em radioproteção *in vivo* foi o de PATT *et al*, em 1949, que observaram uma proteção em ratos submetidos a doses letais de radiação, quando injetado cisteína antes da irradiação. Desde então, durante várias décadas até os dias atuais, o desenvolvimento destas substâncias radioprotetoras tem sido amplamente estudado no campo da radiobiologia, com a finalidade de diminuir os efeitos deletérios provocados pelo uso da radiação, principalmente no âmbito do tratamento radioterápico, onde juntamente com a destruição das células tumorais tem-se um grande envolvimento de tecido sadio, causando com isso, diversos prejuízos ao indivíduo irradiado.

HOLLÓ *et al.*, em 1960, avaliaram a prevenção pelos sais de selênio injetados após a irradiação, aos danos causados pela radiação X. Para isto, foram utilizados ratos que receberam uma dose total de 800 R de radiação no corpo todo. Após 55-60 minutos da irradiação, os animais foram divididos em cinco grupos, de acordo com a quantidade da solução salina de selênio administrada: grupo controle; grupo injeção de 4,2mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c.; grupo injeção de 4,4mg/kg i.p. + 8/10 dessa dosagem s.c.; grupo injeção de 4,6 mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c e grupo 5mg/kg i.p. + 8/10 desta dosagem s.c . Como resultado foi verificado que dos vinte ratos do grupo controle, dezoito morreram entre o quarto e o décimo dia; enquanto que dos grupos de animais tratados com o selênio, todos sobreviveram, exceto o grupo em que foi administrada uma dosagem maior de selênio (5mg/kg), no qual todos morreram.

BRECCIA *et al.*, em 1969, investigaram a radioproteção química em ratos, através da administração intraperitoneal de derivados de selênio, dentre os quais a selenocisteína, o selenocromo e o selenometionina, comparando seus efeitos radioprotetores com o da cisteína. Cinco minutos após a injeção destas substâncias, os ratos foram irradiados com 600R, 750R e 900R de radiação gama, sendo observados por quarenta dias após a exposição. Os resultados permitiram concluir que na dose de 600R, o selenocromo apresentou a mesma proteção da cisteína, enquanto que todos os outros derivados do selênio foram mais eficazes. Com 750R, que representa a dose letal, todos os ratos tratados com derivados de selênio tiveram uma taxa de sobrevivência igual ou maior que 50%, com exceção do selenometionina. Porém, com a dose de 900R, nenhum dos componentes derivados do selênio testados foram eficazes, ao contrário da cisteína.

Em 1971, HURT *et al.* pesquisaram o efeito do selênio na sobrevivência de ratos expostos a radiação crônica do corpo todo. Foram utilizados 74 ratos, os quais foram submetidos a uma dieta com 0,5ppm de selênio (seleniometionine), durante sete semanas e irradiados com radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) diariamente, com uma dose de 188 R até os animais sucumbirem. Foi avaliada a contagem dos hematócitos, dos eritrócitos e dos leucócitos no sangue dos animais, sendo observado que os animais tratados com o selênio tiveram o número de leucócitos

reduzido a partir do sexto dia de irradiação, enquanto que o número de hematócitos e de eritrócitos mostrou-se reduzido somente a partir do décimo terceiro dia. As mortes iniciais surgiram a partir do décimo quarto dia para o grupo controle e décimo quinto dia para o grupo submetido à dieta. Todos os grupos de ratos morreram após o vigésimo quarto dia.

Segundo BOREK *et al.*, em 1986, analisando a ação inibidora radiogênica e os mecanismos do selênio e da vitamina E, o selênio é um constituinte essencial da enzima glutathione peroxidase, que é responsável pela destruição do peróxido de hidrogênio. Nesse trabalho células da linhagem C3H/10T-1/2 foram tratadas com 2,5  $\mu$ M de selênio e 7 $\mu$ M de vitamina E, sendo expostas 24 horas depois à radiação X. Os resultados indicaram um considerável aumento dos níveis de glutathione peroxidase, catalase e proteínas não tióis, quando foi realizado um pré-tratamento com selênio. Quanto ao tratamento com a vitamina E, nenhum aumento nos níveis destas enzimas foi observado. Quando foi feita a interação entre selênio e a vitamina E, não foi constatado aumento na atividade do selênio, porém com um efeito protetor, levando estes autores a concluir que a vitamina E confere proteção apenas como um mecanismo complementar.

Em 1987, WEISS *et al.* avaliaram o efeito radioprotetor e a redução da toxicidade do WR-2721 (amifostina) através do pré-tratamento com o selênio, devido ser essa substância, utilizada em pacientes submetidos a tratamentos radioterápicos, quimioterápicos e a exposições nucleares acidentais e ainda ter seu uso limitado por sua grande toxicidade, incluindo como sintomas náuseas e vômitos. Foi utilizado o selenito de sódio, injetado intraperitonealmente, em um volume que era de aproximadamente 1% por peso corporal do animal, o qual foi submetido a uma dose de radiação de 9Gy de  $^{60}\text{Co}$ . Como resultado, estes autores observaram que quando o selênio foi administrado 24 horas antes da dose letal de WR-2721 (800-1200mg/kg) houve um aumento significativo no número de sobreviventes, sendo potencializado com a dose do selênio. Quando o selênio foi administrado simultaneamente, ele não reduziu a toxicidade do WR-2721. Quando foi analisada a ação somente do selênio, houve um moderado efeito radioprotetor. Estes dados indicaram que o pré-tratamento com o selênio

além de diminuir a toxicidade do WR-2721, provocou também um aumento em sua ação radioprotetora.

SANDSTRÖN *et al.*, em 1989, verificaram que o selênio induz à variação do nível de atividade da enzima glutathione peroxidase, porém não tendo efeito protetor em relação à quebra do DNA e lise celular provocadas pela radiação. Para esse experimento foram utilizados três tipos de células mamárias, as quais sofreram um "banho" de um soro contendo baixa concentração de selênio e após um período de três semanas foi adicionado 100nM de selenito de sódio. A radiação utilizada era produzida por uma fonte de  $^{137}\text{C}$  (raios Gama) de 0,60 Gy  $\text{min}^{-1}$ . Não houve diferença quanto a radiosensibilidade entre o grupo controle e o grupo tratado com o selênio, contrariando a grande diferença da atividade enzimática da glutathione peroxidase, que se apresentava bastante aumentada. Também foi testado o nível de atividade de outras enzimas, como a CuZn superoxide dismutase e a catalase, porém com os resultados minimamente influenciados pelo tratamento com o selênio. A diferença também foi não significativa quanto ao número de quebras no DNA pela radiação em relação ao grupo controle e ao grupo tratado. Os resultados mostraram que o efeito radioprotetor do selênio não é devido a um aumento da atividade da enzima glutathione peroxidase e sim a um possível fator de dependência do selênio.

BJÖRN *et al.*, em 1989, avaliaram o aumento na atividade da glutathione peroxidase em relação à proteção de células humanas contra a ação do peróxido de hidrogênio, através do Selênio. A pesquisa foi feita com células humanas as quais foram tratadas com 100nM de selenite por 10 a 15 dias e expostas ao peróxido de hidrogênio por 30 a 60 minutos. Os autores concluíram que estas células sofreram um aumento considerável no nível de atividade da glutathione peroxidase, porém citam que mesmo com o aumento desta enzima, ela é incapaz de proteger o DNA da ação das radiações ionizantes, agindo apenas na prevenção da lise celular provocada pelo Peróxido de Hidrogênio que não destrói o DNA.

Porém, BOREK, em seu trabalho realizado em 1993, explica que as radiações ionizantes provocam complexas alterações no DNA, e que a radiação X induz ionizações e ataques indiretos de radicais hidroxilas. BOREK ainda cita que quando utilizado o agente anti-carcinogênico (C3H 10T1/2) com células de Hamster pré-tratadas com Selênio e expostas aos diversos tipos de radiações como Raios X, luz Ultravioleta, entre outros, estas células aumentavam o nível de Glutathione peroxidase e catalase, aumentando assim a destruição dos peróxidos. O autor também relata que o Selênio, assim como outras substâncias antioxidantes e certas vitaminas, podem ter ação anticarcinogênica.

LECCIA *et al.*, em 1993, analisaram o efeito protetor do selênio em fibroblastos, contra os danos provocados pela radiação ultravioleta e afirmaram que o mecanismo antioxidante do selênio está estabelecido pela sua ligação com a enzima glutathione peroxidase, sendo responsável pela síntese da apoenzima e pela atividade catalisadora da glutathione peroxidase. Para esse experimento foram utilizadas culturas de fibroblastos, sendo administrado 0,1mg/L de selenito de sódio e expostas à várias doses de radiação UV-B. Como resultado foi observado que o selênio aumentou a atividade da glutathione peroxidase, produzindo um aumento considerável do efeito radioprotetor nos fibroblastos, que aumentava com o acréscimo da dose de radiação, alcançando o seu limite com a dose de 5,8j/cm<sup>2</sup>.

Em 1998, RAFFERTY *et al.* realizaram um trabalho avaliando as diferentes expressões das selenoproteínas em células epiteliais humanas, e a proteção do selênio contra a indução de morte celular pela radiação UVB. Foi analisado o perfil dos queratinócitos, dos melanócitos e dos fibroblastos. As selenoproteínas produziram proteção somente nas duas primeiras células. Em relação aos queratinócitos, a dose de UVB (960j/m<sup>2</sup>) utilizada produziu uma mortalidade de 80%, quarenta e oito horas após a irradiação. Com a adição do selenito de sódio e da selenometionina previamente à exposição, foi obtido um aumento significativo na prevenção à morte celular, com uma proteção mais efetiva do selenito de sódio com doses de 1 a 200nM, sendo considerada aproximadamente 10nM, como dose ideal. Em relação a selenometionina, foi verificado que esta se apresentava menos eficaz comparada ao selenito de sódio, sendo necessárias altas doses

para uma significativa proteção aos raios UVB. Na análise dos melanócitos, estes se apresentavam mais sensíveis às radiações UVB em relação aos queratinócitos, necessitando de uma dose de  $720\text{J/m}^2$  para produzir uma morte de aproximadamente 80% das células, apresentando os efeitos dos Se semelhantes aos encontrados no queratinócitos. Também foi verificado que tanto para os queratinócitos como para os melanócitos, os efeitos do selenito de sódio e da selenometionina foram maiores, quando estes foram administrados vinte e quatro horas antes da exposição, com a máxima dose de proteção em 50nM para o selenito de sódio e de 200nM para a selenometionina. Os autores concluíram que, das trinta selenoproteínas usadas, somente quatorze tiveram ação efetiva contra as radiações UVB, e destas as mais eficazes foram a selenometionina, selenocisteína e o selenito de sódio.

## **2.4 - Uso dos Radioprotetores em Glândulas Salivares:**

**A** pesar dos diversos trabalhos encontrados na literatura sobre a utilização de radioprotetores em glândulas salivares, não se observou nenhuma publicação em que fosse utilizado o selenito de sódio. Assim, os trabalhos revistos com outras substâncias radioprotetoras em glândulas salivares serão usados para obter-se o embasamento científico e conhecimentos dos mecanismos de ação radioprotetora destas substâncias.

O mecanismo de radioproteção do isoproterenol em glândulas parótidas de ratos foi estudado por HALL, em 1974. O isoproterenol catecolamina (ISO) tem o seu mecanismo de radioproteção desconhecido, porém é sabido que esta substância provoca aumento das glândulas salivares através de hiperplasia e hipertrofia. A hiperplasia é observada dois ou três dias após o início do tratamento com o ISO, enquanto que a hipertrofia, principal causa do aumento de tamanho das glândulas, ocorre posteriormente. O mecanismo de radioproteção do ISO ocorre durante o curto período de hiperplasia, provocando também poliplóide nas

glândulas salivares. Nesse trabalho, foram aplicadas doses de 3 e 5 mg de ISO, intraperitonealmente antes da irradiação, induzindo a máxima atividade mitótica das glândulas parótidas, sendo posteriormente irradiadas com uma dose única de 10.000 rads. Os animais foram sacrificados 4 dias após a irradiação. Como resultado, o autor observou que as glândulas que não receberam o ISO, tiveram o seu peso reduzido em cerca de 54%, enquanto que as tratadas apresentaram uma redução de 29% e que a radioproteção do ISO parece estar associada com a replicação celular e não com o estado de poliplóide.

A avaliação da radioproteção através do uso do WR-2721, em relação aos efeitos crônicos da radiação nas glândulas parótidas de ratos, foi realizada por SODICOFF *et al.*, em 1978. Foi injetado 400mg/kg de WR-2721, 15 a 20 minutos antes da exposição à radiação X, sendo avaliado após 30, 60 e 90 dias. Estes autores observaram que o radioprotetor WR-2721 atua contra os danos crônicos a partir de 60 dias, sendo semelhante para o grupo de 90 dias, apresentando o DMF (fator de modificação de dose) para a perda de peso glandular um valor de 2,3. Para a diminuição da concentração da amilase, este valor foi de 3,2. Já para a concentração total de amilase foi de 2,0. Como conclusão, estes autores sugerem que o WR-2721 reduz a xerostomia e ameniza as complicações para os pacientes submetidos ao tratamento radioterápico.

Em 1981, ASAMI & FURUNO, avaliaram o uso do isoproterenol (ISO) em glândulas parótidas de ratos, salientando que esta substância é classificada como um agente  $\beta$ -adrenérgico, que induz a proliferação de células acinares em glândulas salivares de ratos, provocando também a elevação do nível de cAMP (adenosina monofosfatase cíclica). Para isto, os animais foram expostos à radiação X e aplicado DL-isoproterenol, intraperitonealmente, 30 minutos após a irradiação. Como resultado foi observado que os animais que receberam a aplicação do isoproterenol tiveram o cAMP nas glândulas aumentado sete vezes e que estes níveis não eram alterados quando expostos a radiação. Porém os níveis de isoproterenol apresentaram-se reduzidos nos animais expostos à radiação, o que, segundo os autores, não é decorrente da ação direta dos raios X, mas sim de fatores sistêmicos provocados pela radiação.



A avaliação da radioproteção de glândulas parótidas pela adenosina monofosfatase cíclica (cAMP), foi realizada por SODICOFF & CONGER, (1983a). Foram utilizadas glândulas parótidas de ratos, que foram submetidos à diversas doses radiação X unilateralmente, sendo que os animais receberam uma solução salina contendo 30 mg/kg de cAMP 20, 60, 90 e 120 minutos antes e 30 minutos após a irradiação. Os autores observaram que os danos à glândula parótida aumentavam com o aumento da radiação, e que os animais tratados com cAMP apresentaram danos menores em relação ao controle, com um fator de modificação da dose (DMF) de 1,89. Não houve diferença significativa nos diversos tempos em que foi administrado o cAMP, com exceção do grupo no qual foi administrado o cAMP após a exposição, o qual não apresentou nenhuma proteção evidente, demonstrando que o cAMP atua como verdadeiro radioprotetor, e não simplesmente no processo de reparo glandular.

Estes mesmos autores (1983b) avaliaram a radioproteção da glândula parótida pelo WR-2721 e pelo Isoproterenol (ISO), analisando sua modificação pelo Propanolol (PROP). A estimulação dos  $\beta$ -receptores da glândula parótida pelo Isoproterenol resulta em um imediato aumento da atividade da adenilato ciclase, com um subsequente aumento do cAMP. Assim, os autores investigaram se a estimulação dos  $\beta$ -receptores e o conseqüente aumento da taxa de cAMP, protegem a glândula parótida dos efeitos da radiação. Para isto, foram aplicados intraperitonealmente em ratos, 400 mg/kg de WR-2721, 1 ml de 0.5% de solução de isoproterenol e 20 mg/kg de  $\beta$ -bloqueador propanolol, 20 minutos antes da irradiação unilateral das parótidas. Os resultados mostraram que tanto o ISO como o WR-2721, apresentaram significativa proteção em relação ao controle. Quando o ISO foi aplicado com o PROP, a proteção exercida pelo ISO foi eliminada; já a administração do WR-2721 com o PROP aumentou o efeito radioprotetor do WR-2721. Com isso, estes autores concluíram que o efeito radioprotetor do ISO está relacionada com o  $\beta$ -receptor.

O mecanismo da degranulação das glândulas salivares provocado por agentes químicos, tem sido amplamente relacionado como uma forma de radioproteção. Por isso, COPPES *et al.*, em 1997, revisaram o conceito de

degranulação nas glândulas salivares como mecanismo de radioproteção. Para isto utilizaram ratos nos quais foram administradas drogas estimulantes de saliva (Fenilefrina, Metacolina e Isoproterenol), intraperitonealmente, antes de uma dose única de 15 Gy de raios X, sendo avaliados nos períodos de 1, 3, 6, 10 e 30 dias. Quanto a degranulação, foi verificado que na glândula parótida, somente o isoproterenol causou a completa degranulação das células acinares. Na glândula submandibular, as substâncias fenilefrina e/ou metacolina causaram a degranulação das células dos túbulos convolutos granulares, porém as células acinares apresentaram-se semelhante ao controle. Entretanto, quando administrado o isoproterenol o resultado foi inverso. Na avaliação do fluxo salivar da glândula parótida, foi observado que no pré-tratamento com isoproterenol e metacolina + fenilefrina, o fluxo salivar apresentou uma menor redução em relação ao grupo irradiado e que nenhuma alteração foi observada com a administração de fenilefrina. Na glândula submandibular, nenhuma das substâncias testadas causou alteração no fluxo salivar. Com estes resultados, os autores concluíram que no período entre 3-30 dias, os efeitos da radiação foi significativamente reduzido com a aplicação da fenilefrina, isoproterenol e metacolina + fenilefrina, mostrando que o mecanismo radioprotetor destas substâncias não está relacionado com o efeito da degranulação das células acinares.

A utilização de adrenérgicos para a proteção das glândulas salivares contra os efeitos adversos provocados pela radiação, foi verificado por NAGLER & DOV LAUFER, em 1998. Foram testadas a pilocarpina e a ciclocitidina, que são conhecidas como substâncias capazes de estimular a salivação, provocando com isso a degranulação das glândulas salivares. Segundo estes autores, existe uma teoria que explica que a morte das células serosas ocorre imediatamente após a destruição da membrana dos grânulos de secreção, devido à liberação de metais pesados, contidos no interior destes grânulos, induzindo a formação de radicais livres. Foram analisadas e comparadas as glândulas parótidas e submandibulares, irradiadas com dose única de 15 Gy de raios X, sendo administrada pilocarpina e ciclocitidina uma hora e meia, antes da irradiação. As salivas foram coletadas 4 dias e 2 meses após a irradiação, sendo verificada uma redução significativa do fluxo salivar da glândula parótida no 4º dia, porém após dois meses o grupo

tratado com ciclocitidina não apresentou diferença estatística comparada ao grupo controle. Na glândula submandibular, não houve diferença significativa no fluxo salivar no 4º dia, porém após dois meses, foi observada redução do fluxo em todos os grupos irradiados. Com isto, estes autores concluíram que a glândula parótida apresentou-se mais sensível a radiação em relação à glândula submandibular e que a ciclocitidina apresentou uma capacidade de degranulação das glândulas salivares maior que a pilocarpina.

Visto que a radioterapia dos tumores da região de cabeça e pescoço envolve as glândulas salivares, provocando vários efeitos adversos para a vida diária do paciente, como a xerostomia, ROESINK *et al.*, em 1999, também avaliaram o efeito do tratamento de pilocarpina na função de glândulas parótidas irradiadas. Segundo os autores, a pilocarpina é um estimulador de fluxo salivar utilizado freqüentemente em pacientes com xerostomia pós-radioterapia, porém sua função é dependente de sua aplicação, ou seja, seu uso é contínuo para o resto da vida em pacientes que tiveram alterações estruturais nas glândulas salivares. Os autores utilizaram ratos, cujas glândulas parótidas foram submetidos a doses de 10, 15, 20 e 30 Gy de radiação X, unilateralmente (servindo a glândula contra-lateral de controle), sendo administrado 4 mg/ml de pilocarpina 1 hora antes da irradiação. A saliva foi coletada 4 horas antes da irradiação e, 3, 7, 10 e 30 dias após a irradiação. Foi verificada uma grande redução, dose-dependente, do fluxo salivar nas glândulas irradiadas. As glândulas não irradiadas não apresentaram alteração em sua função. Nas glândulas tratadas com pilocarpina, quando utilizadas doses abaixo de 15 Gy, não houve diferença significativa quanto sua função em relação às glândulas não tratadas. Doses de 15 e 20 Gy, causaram um menor prejuízo na função quando comparadas às glândulas não tratadas, porém no grupo de 30 Gy, o efeito da pilocarpina não foi mais observado. Com isto, os autores concluíram que a habilidade da pilocarpina em atenuar os efeitos da radiação depende da dose aplicada, indicando que um certo dano à glândula deve existir para que haja resposta ao tratamento. Entretanto, quando ocorrem danos muito grandes às células, o tratamento com pilocarpina não apresenta resultados significativos.

A proteção das glândulas salivares pela aminofostina em coelhos foi avaliada por BOHUSLAVIZKI *et al.*, em 1999. Foram estudados dois grupos de coelhos; o grupo que recebeu 200 mg/kg de aminofostina intravenoso e o grupo controle que recebeu a mesma quantidade de solução salina, antes de uma alta dose com um radioisótopo de iodo (Radiodine  $^{131}\text{I}$ ). Após 24 semanas da aplicação do  $^{131}\text{I}$ , todos os animais foram sacrificados e as glândulas salivares removidas para o exame histopatológico. Foi observada uma grande diferença entre os dois grupos: o grupo controle apresentava uma grande quantidade de lipomatose, enquanto que no grupo tratado com aminofostina esta lipomatose era negativa. Não foram verificados sinais de inflamação em nenhum dos grupos. Com isto estes autores concluem que a aminofostina apresentou uma ação radioprotetora, pois reduziu significativamente os danos provocados pela alta dose de radioiodine ( $^{131}\text{I}$ ).

Recentemente, em 2000, os autores NAGLER *et al.* avaliaram a proteção das glândulas parótidas através de tratamento com superóxido dismutase, quando submetidas à irradiação. Ratos machos foram submetidos a uma dose única de 15 Gy de raios X. Esses animais foram divididos em 3 grupos: o controle; um grupo no qual foi administrado 50mg/Kg de superóxido dismutase de Mn 90 minutos antes da irradiação; e um grupo que recebeu 100mg/Kg de superóxido dismutase de Cu/Zn 30 minutos antes e após a irradiação. Os animais do grupo irradiado tiveram uma significativa redução no peso corporal 7 dias após de irradiação. As glândulas parótidas e submandibulares foram avaliadas, quanto à sua função, 2 meses após a irradiação, sendo verificado que o tratamento com o Mn ofereceu uma proteção parcial nas glândulas parótidas, porém este mesmo achado não foi verificado nas glândulas submandibulares. O grupo que recebeu tratamento com o Cu/Zn não apresentou nenhuma proteção em relação às glândulas salivares avaliadas. No entanto, quando avaliada a proteção destes elementos quanto à mielosupressão, foi verificado que ambas as substâncias apresentaram um efeito protetor.

Os efeitos da radiação nas glândulas parótidas foram classificados de acordo com o tempo/alterações por COPPES *et al.*, em 2001. Estes autores descreveram as

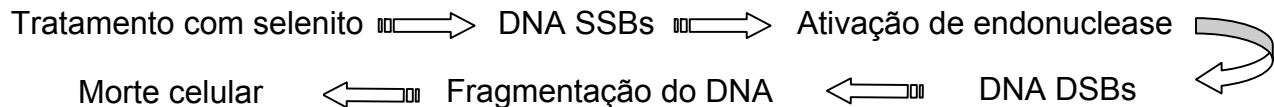
alterações em 4 fases distintas: danos agudos (0-10 dias), danos recentes (10-60 dias), danos intermediários (60-120 dias) e danos tardios (120-240 dias). No mesmo estudo, foram avaliadas as alterações causadas pela radiação em todas as etapas e a propriedade radioprotetora dos receptores adrenérgicos e muscarínicos, seguidos de irradiação com dose única de 15 Gy de radiação X. A saliva foi coletada nos seguintes tempos: 4 dias antes, 1, 3, 7, 10, 30, 60, 120, 180 e 240 dias após a irradiação, enquanto que as glândulas para o estudo morfológico foram removidas nos seguintes períodos: 1, 3, 7, 10, 30, 60, 120, 180 e 240 dias. Nos grupos sem o tratamento das drogas receptoras adrenérgicas e muscarínicas, o fluxo salivar apresentou um acentuado declínio, com o máximo no 6º dia pós-irradiação, havendo um decréscimo na secreção de amilase a partir do 10º dia, atingindo um mínimo em 60 dias. As alterações no número de células acinares, só foram observadas a partir do 10º dia, enquanto que o aumento no número de vacúolos nas células acinares foi observado imediatamente após a irradiação. Um discreto aumento na quantidade de tecido fibroso foi observado a partir do 60º dia. Nos grupos tratados com os receptores adrenérgicos e muscarínicos, uma simples aplicação da droga pode atenuar a o comprometimento funcional da glândula após a irradiação nas fases agudas (0-10 dias) e recentes (10-30 dias).

## **2.5 - Efeito do selênio na integridade do DNA:**

**S**abendo-se que a radiação acomete graves prejuízos às glândulas salivares, e que diversos radioprotetores tem sido pesquisados, é importante o conhecimento do risco-benefício destas substâncias na integridade dos tecidos onde serão administrados.

Em 1994, LU et al. estudaram o efeito do selenito na integridade do DNA e apoptose em células de ratos leucêmicos. Para isto, foram utilizadas células do grupo L1210 submetidas a tratamento com concentrações que variavam de 0-20

·M de selenito. Foi verificado que o tratamento com selenito induz a quebra simples de filamento do DNA (*single-strand break* - SSBs), seguido da ativação de endonucleases que produzem a quebra dupla de filamento do DNA (*double-strand break* - DSBs) até a indução da morte celular por apoptose. Também foi verificado que os dois tipos de quebra de DNA tiveram comportamentos diferentes em relação à concentração de selenito, apresentando um aumento no DNA SSBs de 415% entre 0 a 5  $\mu$ M e de 48% entre 5 a 10  $\mu$ M, enquanto que para o DNA DSBs o aumento foi de 33% para o nível de 0 a 5  $\mu$ M de selenito e de 130% para 5 a 10  $\mu$ M. Estes autores propuseram, ainda, uma seqüência de eventos que culmina na apoptose e morte das células tratadas com selenito:



Em 1995, WU *et al.* pesquisaram a ação do metabolismo do selênio e a indução de morte celular através do seleniodiglutatione, comparando seus efeitos celulares com os do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Para tanto, os autores utilizaram células mamárias de ratos da linhagem C57, utilizando também uma célula clonada desta, que se denominava B19. Esta célula clonada era resistente ao seleniodiglutatione, que é o primeiro metabólito formado quando há a redução do selenito em glutathione e é um agente anti-carcinogênico, apresentando também uma alta toxicidade que pode provocar a apoptose. Os resultados mostraram que o seleniodiglutatione causou mudanças morfológicas celulares similares ao peróxido de hidrogênio, sugestivo de apoptose, porém através de mecanismos diferentes, fato que foi verificado nas células resistentes ao seleniodiglutatione que se apresentavam igualmente sensíveis ao  $H_2O_2$ , sendo induzidas à morte celular. Estes autores concluem que tanto o seleniodiglutatione como o peróxido de hidrogênio induzem à morte celular, porém o mecanismo como isso ocorre não foi esclarecido.

Ainda em 1995, LU *et al.*, avaliaram a genotoxicidade do selênio, dissociando-a dos efeitos inibitórios de crescimento celular (ação anticarcinogênica), ou seja, tinham como objetivo avaliar se a quebra do DNA

(single-strand break) poderia ser dissociada dos efeitos biológicos, que estão associados com a inibição do câncer. Foram utilizados vários derivados do selênio, dentre eles o selenito de sódio, com uma linhagem de células tumorais epiteliais de mama de ratos (MOD). Os autores verificaram que a ação inibitória do crescimento pode ser dissociada da genotoxicidade, porém o selenito induz a quebra de DNA (single e double-strand break) e à morte celular. Também foi verificado que o mecanismo de ação molecular dos compostos de selênio são diferentes, visto que o metilseleniocianato e o SE-metilselenocisteína não induzem ao DNA single-strand break, mas produzem inibição da proliferação celular e de morte celular.

O estudo da inibição da atividade do mecanismo de ligação do DNA através do uso do selenito e o do selenodiglutatione (GS-Se-SG) foi avaliado por SPYROU *et al.*, em 1995. Uma vez que o complexo AP-1 é um importante fator de transcrição para a regulação do crescimento e diferenciação celulares, estes autores avaliaram a ligação desse complexo com o DNA, utilizando extratos nucleares de linfócitos humanos 3B6. Para isso, foram realizados pré-tratamentos com selenito e com selenodiglutatione nos linfócitos intactos e também diretamente no extrato nuclear. Os resultados demonstraram que quando aplicados diretamente no extrato nuclear, durante 10 minutos, foi necessária uma dose de 7,5  $\mu\text{M}$  de selenito de sódio para uma inibição de 50% da ligação AP1-DNA e de 0,75  $\mu\text{M}$  para a mesma taxa de inibição, utilizando o GS-Se-SG, enquanto que para o selenato, foi necessária uma alta concentração (250  $\mu\text{M}$ ). Quando foram aplicados estes componentes com as mesmas doses em linfócitos intactos, a inibição da ligação AP1-DNA foi de 50% para o selenito, enquanto que não houve inibição para o selenato. Com isso estes autores concluíram que o selenito e o GS-Se-SG são potentes inibidores do AP1-DNA e, conseqüentemente, inibidores do crescimento celular, mostrando ser um possível mecanismo da inibição do crescimento de células tumorais.

Em 1999, STEWART *et al.*, analisaram três componentes de selênio quanto sua toxicidade, à atividade da enzima glutathione peroxidase, à apoptose e à radioproteção. Para isto, foram utilizadas culturas de células de ratos

(queratinócitos) previamente tratadas com Selenito, Selenocistamina e Selenometionine, sendo feitas as análises, 24 horas após. Quanto à toxicidade, foi verificado que o selenito é o mais citotóxico, induzindo citotoxicidade em doses acima de 10 µg Se/ml, enquanto que o selenometionine não apresentou toxicidade em nenhuma das doses analisadas. Com relação à atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase, foi verificado que todos os derivados de selênio testados causaram um aumento em sua concentração, estando diretamente ligado com os resultados preventivos das lesões oxidativas no DNA, provocadas nas células testadas com a exposição à radiação UVB. Quanto ao índice de apoptose, foi verificado que o selenito apresentou o maior índice, seguido pela selenocistamina, enquanto que o selenometionine não apresentou índices significativos de apoptose.



### **3. PROPOSIÇÃO**

**E**m função do pequeno volume de informações na literatura sobre a radioproteção destas glândulas e, principalmente, por não se ter encontrado, nenhum trabalho utilizando o Selenito de Sódio como radioprotetor, a realização desta pesquisa tem como proposição avaliar, ultra-estruturalmente, os efeitos agudos da radiação e o efeito radioprotetor do selenito de sódio nas células acinares de glândulas parótidas de ratos, submetidas à irradiação local de 15 Gy de radiação Gama.

## 4. MATERIAIS E METODOS

### 4.1 - Animais:

**A**pós a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, foram utilizados para a presente pesquisa 57 ratos de mesma linhagem (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar), machos, com idade entre 60 e 90 dias e peso variando entre 150 e 300 gramas, sendo os mesmos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos, desde as fases de pré-tratamento e pré-operatória até o sacrifício, em gaiolas de polycarbonato, que se encontraram em local com temperatura e umidade controladas, com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água “*ad libitum*”, diariamente.

### 4.2 - Grupos experimentais:

A amostra foi dividida, de forma aleatória, em quatro grupos experimentais: **Grupo Controle**, constituído por animais nos quais foi injetado 0,15ml de água destilada, intraperitonealmente, simulando a administração do selênio; **Grupo Irrradiado**, cujos animais receberam também a mesma dose de água destilada e foram submetidos à irradiação; **Grupo Selênio**, constituído por animais que receberam uma dose de 0.5 mg Se/kg b.w de selenito de sódio

intraperitonealmente, e o **Grupo Selênio/Irradiado**, cujos animais receberam a mesma dose de selênio administrada no grupo selênio, sendo submetidos à irradiação 24 horas após.

Os animais foram sacrificados seguindo os diversos tempos pré-determinados, sendo divididos em sub-grupos: 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

#### **4.3 - Tratamento com Selenito de sódio:**

Selenito de sódio (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) (fig 1) foi diluído em água destilada e injetado intraperitonealmente nos animais correspondentes aos grupos selênio e selênio/irradiado (fig 2). Nos animais dos grupos controle e irradiado, foi administrada água destilada na quantidade equivalente à solução de selenito de sódio. A solução de selenito de sódio e a água destilada foram injetadas no mesmo dia.



Prancha 1 – Selenito de Sódio Pentahidratado (pró-análise).



Prancha 2 – Aplicação da solução de selenito de sódio intraperitonealmente.

#### **4.4 - Fase de Irradiação:**

Vinte e quatro horas após a injeção da solução de selenito de sódio e de água destilada, os animais dos grupos irradiado e selênio/irradiado foram

anestesiados com pentabarbital de sódio (40mg/Kg) e recobertos por uma lâmina de chumbo de 4,0 mm de espessura, deixando livre apenas a região de cabeça e pescoço (fig 3). Posteriormente, esses animais foram irradiados, simulando uma radioterapia de cabeça e pescoço, utilizando-se feixes de radiação gama ( $Co_{60}$ ) emitidos por um aparelho da marca Alcion CGR II (Siemens) (fig 4). O tamanho do campo irradiado foi de 30 X 30cm, para que fossem irradiada somente a região da cabeça e pescoço, sendo posicionados oito animais por vez, a uma distância focal de 80 cm e uma dosagem máxima de energia a uma profundidade de 0,5 cm. O rendimento do aparelho foi de 107 Gy/min, operando com energia de 1,25 MeV, com dose total aplicada de 15 Gy.



Prancha 3 – Proteção do restante do corpo do animal, com exposição somente da região da cabeça.



Fig 4 - Posicionamento dos animais para a exposição à radiação.

#### **4.5 - Fase de Obtenção das Peças:**

Após os tempos previamente estabelecidos, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de pentabarbital de sódio, com dose de 40mg/kg de peso corpóreo para a obtenção das peças (fig 5 e 6). Foram removidas as glândulas parótidas de ambos os lados, as quais foram devidamente lavadas com solução fisiológica, secadas em papel absorvente e mantidas em recipientes com

fixador até à inclusão. Posteriormente à obtenção das peças, os animais foram sacrificados com prolongamento do anestésico (éter etílico).



Fig 5 - Incisão cirúrgica para a remoção da glândula parótida.



Prancha 6 – Remoção da glândula parótida.

#### **4.6 - Preparação Tecidual:**

As peças foram imediatamente fixadas após a remoção em glutaraldeído 2,5%, pH 7,3 0,1 M tamponado, de 4 a 6 horas em ambiente resfriado (4° C). Posteriormente as peças foram fixadas 1 hora em tetróxido de ósmio 1%, 0,1M tamponado à temperatura ambiente e desidratadas em soluções crescentes de acetona 50%, 70%, 80% e 90%, permanecendo por 10 minutos em cada solução e, posteriormente, em solução de acetona pura (Merk) utilizando-se 3 lavagens de 20 minutos cada. As peças foram colocadas em uma mistura de acetona/resina, na proporção de 1:1, onde ficaram “over-night”. Posteriormente, foram colocadas em resina pura a temperatura de 37°C por uma hora, sendo então incluídas em recipientes de plásticos apropriados e colocadas em estufa a 70°C por 48 horas para a polimerização da resina, obtendo-se assim os blocos de resina. Estes foram trimados para eliminar o excesso de resina e então realizada a microtomia em cortes semifinos (1-2  $\mu$ m) em um ultramicrotomo com navalhas de vidro, corados com azul de toluidina, para então ser feita a seleção da região a ser estudada ao microscópio eletrônico de transmissão. Posteriormente os blocos

foram novamente trimados para proceder à obtenção dos cortes ultrafinos (50-100 nm), utilizando-se navalhas de diamante.

#### **4.7 - Análise das Telas:**

As telas foram analisadas utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Transmissão da marca Zeiss EM-10, sendo realizadas avaliações ultra-estruturais das organelas citoplasmáticas e nucleares das células acinares das glândulas parótidas em todos os grupos estudados por dois examinadores previamente treinados.

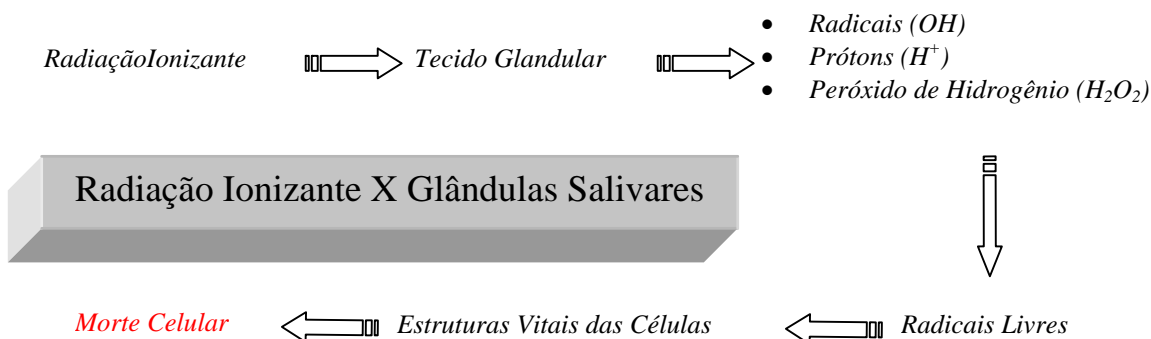
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso das radiações ionizantes para fins terapêuticos apresenta-se, nos dias atuais, como um grande aliado no tratamento de neoplasias malignas, promovendo resultados promissores a pacientes submetidos à radioterapia, podendo ser esta modalidade de tratamento, a terapia de escolha ou fazer parte, concomitantemente com a cirurgia, dos tratamentos combinados para vários tipos de neoplasias malignas (PARISE JÚNIOR, 2000). Porém, uma série de efeitos adversos acompanha os pacientes que são submetidos à radioterapia, interferindo na qualidade de vida dos mesmos. Devido à falta de seletividade, a radiação, acomete não somente às células neoplásicas, mas também às células sãs circunjacentes à área patológica, provocando assim destruição e morte celular em toda a região irradiada.

No tratamento de tumores que acometem a região de cabeça e pescoço, a radioterapia é bastante utilizada, devido à grande agressividade destas neoplasias. Porém, como em toda radioterapia, os tecidos adjacentes são agredidos, entre eles as glândulas salivares, que apesar de serem formadas por um tecido bastante diferenciado, são bastante sensíveis à radiação (COPPES *et al.*, 1997), sendo que o seu mecanismo de destruição ainda não está bem esclarecido.

As alterações estruturais nas glândulas salivares determinam uma série de sintomatologia para o paciente, como xerostomia, afecções inflamatórias, aumento do índice de cáries dentais, mucosites e disfagia (COPPES; VISSINK; KONINGS, 2002; NAGLER; BAUM; FOX, 1993; STEPHENS *et al.*, 1989). A sintomatologia decorrente da irradiação de glândulas salivares é ocasionada pela destruição estrutural das células acinares, assim como pelas alterações em organelas (mitocôndrias, retículos endoplasmático, grânulos de secreção) e até mesmo por alterações nucleares, levando as células a um processo de apoptose, determinando a redução, ou até mesmo a ausência, da principal função destas células que é a excreção, podendo causar danos que são irreversíveis ao paciente (PRATT & SODICOFF, 1972; SHOLLEY, SODICOFF, PRATT, 1974; STERN *et al.*, 1976; MESSELT & DAHL, 1983; VISSINK *et al.*, 1991).

A interação da radiação ionizante com os tecidos vivos, ocorre através de várias etapas, levando à alterações que podem culminar na destruição e morte celular, podendo ser representada e melhor entendida pelo esquema abaixo (KUMAR *et al.*, 1988):



No presente estudo, a glândula parótida foi o tecido de escolha, visto que segundo PETER *et al.*, (1994); COPPES *et al.*, (1997) e NAGLER & DOV LAUFER, (1998), esta apresenta uma maior radiosensibilidade em comparação às demais glândulas salivares. Isto pode ser explicado devido esta glândula ser classificada como uma glândula serosa, uma vez que em sua constituição aproximadamente 80% das células acinares são serosas, sendo mais radiosensíveis em relação às células acinares mucosas, que compõem as



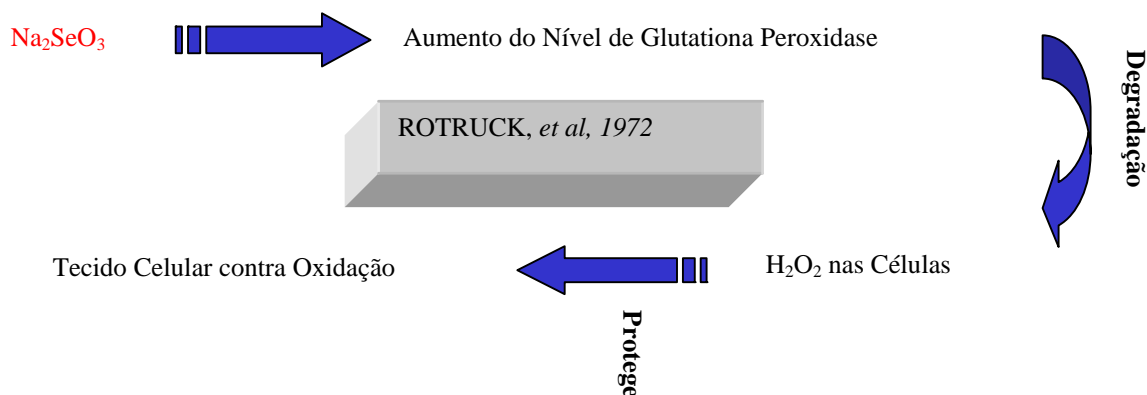
demais glândulas salivares, como citado por ROSLINDO *et al.* (1989), que observaram ser os ácinos serosos e ductos estriados de glândulas parótidas as estruturas com maior radiosensibilidade. COPPES *et al.* (1997), ainda relatam que apesar das glândulas salivares apresentarem-se compostas por tecido altamente diferenciado e não apresentarem um metabolismo elevado, o que indicaria uma radorresistência, a morte das células parenquimais e um decréscimo no fluxo salivar, são observados nas primeiras 24 horas após a irradiação.

NAGLER & DOV LAUFER (1998) explicam que a possibilidade da glândula parótida apresentar-se mais radiosensível em relação à glândula submandibular, pode estar no fato de que os grânulos de secreção, presentes nas células serosas, apresentam em seu interior metais pesados. Havendo o rompimento da membrana destes grânulos, pela ação da radiação ionizante, os metais são liberados para o tecido, produzindo a formação de radicais livres que provocam a morte celular. Acrescenta-se ainda que a morte celular pode ser decorrente dos radicais livres produzidos a partir dos metais liberados e também decorrente da interação entre a radiação e o tecido.

ANDERSON, IZUTSU & RICE, em 1981, relatam que as mudanças estruturais nas glândulas salivares decorrentes da radiação ionizante variam de acordo com a região, apresentando diferentes radiosensibilidades. Os ácinos apresentam a maior radiosensibilidade, sendo, portanto a parte mais sensível da estrutura glandular, enquanto que os ductos estriados e convolutos apresentam uma radiosensibilidade intermediária; já os ductos externos e extralobulares apresentam-se radorresistentes.

Diante desta radiosensibilidade e das seqüelas decorrentes da irradiação nas glândulas salivares, o uso de radioprotetores nestas estruturas é plenamente justificável. Neste estudo, o radioprotetor de escolha foi o selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), com sua ação antioxidante e radioprotetora comprovadas por diversos trabalhos (HOLLÓ *et al.*, 1960; BRECCIA *et al.*, 1969; HURT *et al.*, 1971; WEISS *et al.*, 1987; LECCIA *et al.*, 1993; RAFFERTY *et al.*, 1998). Outros autores como

BOREK *et al.* (1986); BJÖRN *et al.* (1989); BOREK (1993) e LECCIA *et al.* (1993) são unânimes em afirmar que o efeito radioprotetor do selênio se dá devido sua atuação na elevação da atividade da enzima glutathione peroxidase, permitindo que haja uma maior captura dos radicais livres produzidos pela radiação. Esta relação entre selênio e glutathione peroxidase já havia sido estabelecida por ROTRUCK *et al.*, em 1972, conforme esquema a seguir:



A dose de selenito de sódio utilizada nesta pesquisa, foi de 0.5 mg/kg de peso corpóreo do animal, estando abaixo dos padrões de toxicidade segundo ELLENHORN & BARCELOUX (1998), que afirmam que a dose mínima para a toxicidade é de 1 a 5 mg/kg para o selenito. Importante ressaltar que no decorrer deste experimento nenhum animal foi a óbito após a aplicação do selenito de sódio.

Na fase de irradiação, utilizou-se a dosagem única de 15 Gy de  $^{60}\text{Co}$ , seguindo a metodologia prévia de diversos trabalhos (STEPHENS *et al.*, 1989; VISSINK *et al.*, 1991; NAGLER, BAUM, FOX, 1993; PETER *et al.*, 1994a, PETER *et al.*, 1994b; NAGLER *et al.*, 1996; COPPES, VISSINK, KONINGS, 2002), podendo-se verificar que esta dose foi de escolha nos trabalhos mais recentes.

Os tempos estabelecidos no presente estudo, para a avaliação do tecido glandular, tiveram como finalidade avaliar os efeitos agudos da radiação, pois segundo COPPES *et al.* (2001), as alterações estruturais nas glândulas salivares são divididas em 4 fases distintas: danos agudos (0-10 dias), danos recentes (10-

60 dias), danos intermediários (60-120 dias) e danos tardios (120-240 dias). Diversos trabalhos (PRATT & SODICOFF, 1972; SHOLLEY, SODICOFF, PRATT, 1974; READE & STEIDLER, 1985; NAGLER, BAUM, FOX, 1993) demonstram que as maiores alterações estruturais ocorrem nas primeiras 48 horas, tendo seu início logo após a irradiação. Como o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio, optou-se por intervalos de tempo menores, a fim de se observar maiores alterações, com o intuito de avaliar a capacidade radioprotetora desta substância durante a fase aguda.

Analizando a ultraestrutura das glândulas parótidas (Prancha 1-figs. 1.1, 1.2 e 1.3), verificou-se a presença das células acinares com grande quantidade de grânulos de secreção seroso, que se apresentam eletrondensos à microscopia eletrônica, distribuídos por todo o citoplasma celular (Prancha 1-fig. 1.4). É possível também verificar a presença de diversas organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e complexo de golgi (Prancha 1-fig. 1.5). Os núcleos apresentam-se com a cromatina dentro do aspecto de normalidade, sendo envoltos pela membrana nuclear de espessura normal (Prancha 1-fig. 1.6).

As análises realizadas pela microscopia eletrônica mostraram que 4 horas após a irradiação, o grupo irradiado apresentava alterações ultra-estruturais claramente evidentes, observando-se desorganização tecidual dos ácinos (Prancha 2-fig. 2.1), representada pela acentuada degeneração citoplasmática com formação de estruturas amorfas conhecidas como corpos claros e corpos citolíticos. Como citado por SHOLLEY, SODICOFF & PRAT (1974), o corpo citolítico é uma degeneração citoplasmática que contém fragmentos de retículo endoplasmático granular, mitocôndrias, grânulos de secreção e material denso amorfo. O corpo claro é caracterizado pela presença de fragmentos citoplasmáticos das células acinares, contendo ribossomos livres, fragmentos nucleares, retículo endoplasmático granular e grânulos de secreção. Esta descrição é coincidente com os achados nesta pesquisa, indicando, portanto, a degeneração citoplasmática. As organelas mais sensíveis foram os grânulos de secreção (Prancha 2-fig. 2.2), seguidos pelas mitocôndrias (Prancha 2-figs. 2.3 e

2.4). Porém, também se observou alterações no retículo endoplasmático granular, sendo semelhantes aos achados de PRATT & SODICOFF (1972), STERN *et al.* (1976) e MESSELT & DAHL (1983). Havia presença de núcleos atróficos e com cromatina condensada, sinais indicativos de apoptose (Prancha 2-fig. 2.5).

Os achados de alterações ultra-estruturais decorrentes da irradiação, logo no primeiro tempo avaliado, são concordantes com os trabalhos de PRATT & SODICOFF (1972) e READE & STEIDLER (1985), onde estes autores demonstram que os danos ultra-estruturais decorrentes da ação da radiação foram evidentes a partir da 3<sup>a</sup> hora e da 2<sup>a</sup> hora pós-irradiação, respectivamente. Isto demonstra que as alterações ultra-estruturais nas glândulas salivares ocorrem logo nas primeiras horas pós-irradiação, sendo semelhante também com os achados de NAGLER, BAUM & FOX (1993).

Após 8 horas da irradiação, o tecido apresentava acentuado comprometimento citoplasmático, observando-se destruição de organelas (Prancha 2-fig. 2.6). Havia uma maior concentração de núcleos apresentando cromatina condensada (Prancha 3-figs. 3.1 e 3.2), com presença de diversos fragmentos de cromatina, observando-se alterações também na membrana nuclear (Prancha 3-fig. 3.3), sendo semelhante aos achados de VISSINK *et al.* (1991), que relatam haver distensão da membrana nuclear. Estes achados podem corresponder a uma redução dos efeitos agudos no citoplasma, porém apresentando-se ainda em fase ativa nos núcleos, o que pode ser verificado nas características de apoptose nuclear.

No presente estudo, as principais alterações decorrentes da ação da radiação foram encontradas nos dois primeiros tempos, ou seja, 4 e 8 horas após a irradiação, demonstrando seu ápice no tempo de 8 horas. Estes achados são concordantes com os trabalhos de PRATT & SODICOFF (1972), SHOLLEY, SODICOFF & PRATT (1974), STERN *et al.* (1976) e READ & STEIDLER (1985), onde os mesmos afirmam que as principais alterações são encontradas nas primeiras 48 horas, porém discordantes, quanto ao tempo de maior alteração, que nos trabalhos destes autores, aconteceram no 2<sup>o</sup> dia. Esta diferença de resultado

pode ser decorrente do uso de doses de radiação diferentes daquela utilizada neste trabalho.

O início da reparação do tecido glandular começou a ser observada 24 horas após a irradiação (Prancha 3-fig. 3.4), porém ainda notava-se a presença de alguns núcleos com cromatina condensada (Prancha 3-fig. 3.5) e fragmentos citoplasmáticos em algumas regiões (Prancha 3-fig. 3.6). Uma maior quantidade de organelas íntegras foi observada em relação aos tempos 4, 8 e 12 horas, como mitocôndrias, grânulos de secreção, complexo de Golgi e retículos endoplasmáticos (Prancha 4-fig. 4.1). A presença de degenerações citoplasmáticas como os “corpos citolíticos” foi observada em regiões localizadas e não esparsas no tecido celular, como observado no tempo 4 horas (Prancha 4-figs. 4.2 e 4.3).

No trabalho de SHOLLEY, SODICOFF & PRATT (1974), utilizando doses de 1600 e 6400 R de raios X, as alterações apresentaram regressão a partir do 3º dia, enquanto que no trabalho de STERN *et al.* (1976), onde foi utilizada dose única de 200 R corpo todo de radiação de nêutrons, a regressão se deu somente a partir do 7º dia.

Nos próximos tempos avaliados nesta pesquisa, que foram 48 e 72 horas, verificou-se uma progressão no processo de reparação do tecido glandular, sendo que após 48 horas, verificou-se que a reparação celular já se apresentava melhor em relação aos demais tempos (4, 8, 12 e 24 horas) (Prancha 4-fig. 4.4), porém ainda se observavam áreas com alterações, só que em menor número e grau (Prancha 4 e 5-figs. 4.5, 4.6 e 5.1), o que parece demonstrar que o tecido irradiado está em processo de reparação.

Este processo de reparação foi confirmado no último tempo, ou seja, após 72 horas de irradiação. Observou-se um tecido bem mais organizado, com pequenas áreas de degeneração citoplasmática e a presença de vacúolos em algumas regiões, sendo que as mitocôndrias foram as organelas mais sensível (Prancha 5-figs. 5.2 e 5.3), diferentemente dos achados nos tempos de 4 e 8 horas pós-irradiação. Os núcleos apresentavam-se com aspecto de normalidade

(Prancha 5-fig. 5.4). Um fato importante observado neste tempo foi à presença de grande quantidade de mitocôndrias próximos aos núcleos (Prancha 5-fig. 5.5), aliado à presença de retículo endoplasmático granular extensivo (Prancha 5-fig. 5.6), o que pode denotar uma maior síntese celular em decorrência da reparação tecidual. Porém, apesar do tecido apresentar-se mais organizado, sua reparação ainda não está completa, o que permite concluir que nas primeiras 72 horas após a irradiação o tecido ainda encontra-se em fase de reparação.

No trabalho de SCHOLLEY, SODICOFF & PRATT (1974), a normalidade tecidual de glândulas irradiadas ocorreu no oitavo dia pós-irradiação, porém READ & STEIDLER (1985), realizaram um estudo longitudinal das alterações estruturais e verificaram que a completa reparação tecidual ocorre somente no 76º dia pós-irradiação.

No grupo selênio/irradiado, pôde-se observar que 4 horas após a irradiação, o tecido apresentava-se com alterações citoplasmáticas caracterizadas por degenerações em algumas regiões, mostrando-se em menor grau do que no grupo irradiado (Prancha 6-fig. 6.1). Também é nítida uma maior organização celular e a preservação do tecido em relação ao grupo sem a radioproteção no mesmo período. Embora fosse observada a presença de mitocôndrias preservadas, a maior parte apresentava-se comprometida, e diferentemente do grupo irradiado, as maiores alterações nas organelas eram observadas nas mitocôndrias e não nos grânulos de secreção (Prancha 6-figs. 6.2 e 6.3). Os núcleos apresentavam-se com padrões de normalidade (Prancha 6-fig. 6.4). O fato dos grânulos de secreção serem menos danificados no grupo selênio/irradiado, quando comparado ao grupo irradiado, talvez justifique os menores danos observados nos animais do grupo selênio/irradiado, uma vez que não havendo rompimento da membrana dessas estruturas, não houve liberação de metais pesados e assim não houve um aumento na quantidade de radicais livres. Portanto, pode-se supor que o selenito de sódio preveniu o rompimento da membrana dos grânulos de secreção, uma vez que segundo BJÖRN *et al.* (1989), a glutathione peroxidase previne lise celular provocada pelo peróxido de hidrogênio.

Assim, o menor comprometimento dos grânulos de secreção neste período pode representar uma maior proteção tecidual, concordando-se com COPPES *et al.* (1997); NAGLER & DOV LAUFER (1998); ROESINK *et al.* (1999), que citam haver uma teoria que explica que os metais pesados contidos no interior dos grânulos de secreção, como o ferro, o cobre e o zinco, podem ocasionar a destruição tecidual, com formação de radicais livres que entram em contato com o citoplasma, decorrente de uma degeneração deste grânulos. Segundo estes autores, a indução da degranulação das glândulas salivares por agentes adrenérgicos antes da irradiação pode reduzir os efeitos adversos nos tecidos irradiados, o que comprovaria esta teoria.

No grupo selênio/irradiado avaliado 8 horas após a irradiação, observa-se que o tecido ainda apresenta-se organizado, porém com um comprometimento maior em relação ao tempo anterior (Prancha 6-fig. 6.5). Nota-se a presença de degeneração citoplasmática em algumas regiões, com o comprometimento não só das mitocôndrias, que se apresentam dilatadas e destruídas, sendo semelhante com os achados de VISSINK *et al.* (1991), mas também dos grânulos de secreção, formando uma grande quantidade de vacúolos (Prancha 6-fig. 6.6).

O maior comprometimento após 8 horas neste grupo confirma os achados do grupo irradiado sem radioproteção que também teve o seu maior grau de comprometimento tecidual neste período. Porém, quando se compara o grupo selênio/irradiado 8 horas com o grupo irradiado 8 horas, observa-se maior dano no segundo grupo, indicando, portanto o efeito radioprotetor do selenito de sódio.

Nos demais tempos avaliados, verificou-se uma seqüência progressiva de reparação do tecido glandular (Prancha 7-fig.s 7.1 e 7.3), observando-se, em todos os tempos, uma melhor organização em relação ao grupo irradiado, ou seja, uma menor quantidade de degeneração citoplasmática foi observada. No grupo selênio/irradiado de 24 e 48 horas, observou-se a presença de “corpos citolíticos” (Prancha 7-fig.s 7.2 e 7.4), o que parece demonstrar que as alterações nos primeiros períodos, em que são mais intensas, são caracterizadas por degenerações dispersas, enquanto que, quando o processo de reparação tecidual

apresenta-se em um estágio mais avançado, estas alterações apresentam-se localizadas, formando os “corpos citolíticos”.

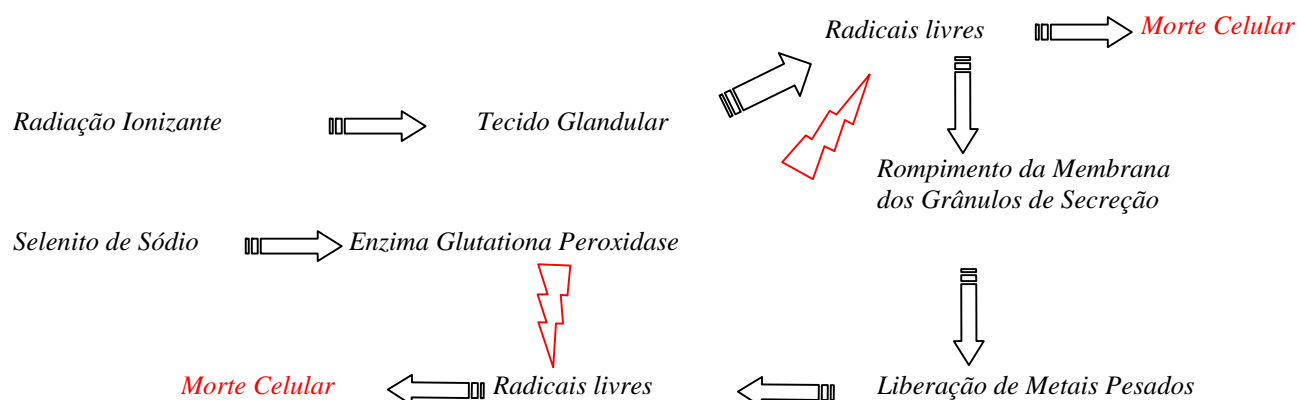
A presença de vacúolos foi observada a partir da 8ª hora, sendo uma constante até o último tempo analisado. Esta vacuolização no citoplasma é decorrente de degenerações de organelas citoplasmáticas, principalmente grânulos de secreção e mitocôndrias.

No último tempo analisado, 72 horas, observou-se que o aspecto geral apresentava-se bem mais preservado (Prancha 7-fig. 7.5), com presença de organelas íntegras (Prancha 7-fig. 7.6). Porém ainda havia a presença de algumas regiões com degeneração citoplasmática e pequena quantidade de vacúolos, o que demonstra que, apesar do tecido apresentar-se mais organizado em relação aos tempos anteriores, não havia ainda, a presença de um tecido totalmente regenerado.

O efeito protetor de vários tipos de substâncias tem sido pesquisado quando da irradiação de glândulas salivares, como o isoproterenol (HALL, 1974 e ASAMI & FURUNO, 1981); Adenosina Monofosfatase Cíclica (SODICOFF & CONGER, 1983a); WR-2721 (SODICOFF *et al.*, 1978 e SODICOFF & CONGER, 1983b); Aminofostina (BOHUSLAVIZKI, 1999); Superoxido Dismutase (NAGLER *et al.*, 2000) e estimuladores de fluxo salivar (COPPES *et al.*, 1997, NAGLER & DOV LAUFER, 1998 e ROESINK *et al.*, 1999). Todas essas substâncias mostraram-se eficazes. A análise dos resultados obtidos neste estudo, demonstram que o selenito de sódio também se mostrou eficaz como radioprotetor, visto que, em todos os tempos analisados do grupo selênio/irradiado, a quantidade de degeneração tecidual e o aspecto ultra-estrutural apresentaram-se melhores em relação ao grupo irradiado, o qual não foi protegido. Porém, a radioproteção exercida pelo selenito de sódio não é completa, pois ainda observa-se a presença de áreas em degeneração em todos tempos analisados. Contudo, pôde-se notar que o grupo no qual foi administrado o selenito de sódio como radioprotetor houve um menor dano ao tecido injuriado pela radiação e conseqüentemente uma reparação tecidual mais rápida.



O efeito radioprotetor evidenciado neste estudo pode ser explicado devido o aumento da enzima glutathiona peroxidase atuando diretamente na captura dos radicais livres provocados pela radiação ionizante quando do contato direto com o tecido irradiado (ROTRUCK *et al.*, 1972; FLOHE *et al.*, 1973; CHOW *et al.*, 1974; HAFEMAN *et al.*, 1974; LAWRENCE *et al.*, 1976; SANDSTRÖN *et al.*, 1989; LECCIA *et al.*, 1993). Porém, a enzima glutathiona peroxidase pode também apresentar um outro mecanismo de radioproteção, especificamente para as glândulas salivares. Segundo autores como COPPES *et al.*(1997); NAGLER & DON LAUFER (1998); ROESINK *et al.* (1999), demonstram que a morte celular causada pela radiação nas glândulas salivares ocorre imediatamente após o rompimento da membrana dos grânulos de secreção, devido aos metais pesados que ocasionam a formação de radicais livres no tecido. Com isso, podemos inferir que o aumento da enzima glutathiona peroxidase, provocada pela administração do selenito de sódio, poderá ter atuado neutralizando, não somente os radicais livres produzidos pelo efeito direto da radiação, mas também evitando o rompimento das membranas dos grânulos de secreção, reduzindo a quantidade de radicais livres formados na liberação destes metais pesados. Estes mecanismos estão indicados no esquema a seguir:



Com a finalidade de se observar a influência do selenito de sódio nas células acinares, analisou-se também um grupo onde foi administrado somente o selenito de sódio, sem a interferência da radiação, pois diversos trabalhos ( LU *et al.*

*al.*, 1994; WU *et al.*, 1995; LU *et al.*, 1995; SPYROU *et al.*, 1995; STEWART *et al.*, 1999) mostraram que o selênio pode levar a danos celulares, tais como mudanças morfológicas, quebra de DNA, e até mesmo à apoptose. Os animais deste grupo foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo que os demais (levando-se em consideração o tempo pós-irradiação dos demais grupos) para que se pudesse realizar uma comparação dos resultados e assim avaliar o risco-benefício da administração desta droga.

No primeiro tempo avaliado, 4 horas a partir do momento da irradiação nos grupos irradiados, o aspecto tecidual estava preservado para este tempo (Prancha 8-fig. 8.1), estando compatível com o grupo controle, apresentando o núcleo e o citoplasma dentro dos padrões de normalidade (Prancha 8-fig. 8.2).

As alterações teciduais tornaram-se evidentes a partir da 8ª hora, onde se observou a presença de alterações de organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias, grânulos de secreção e retículo endoplasmático granular (Prancha 8-fig. 8.3). Observou-se também a presença de vacuolização e de degenerações citoplasmáticas (corpos citolíticos), porém em menor quantidade que nos grupos irradiado e selênio/irradiado (Prancha 8-fig. 8.4).

Estes achados foram observados nos demais tempos avaliados, sendo que no tempo após 24 horas da administração do selênio, observou-se a maior alteração citoplasmática e nuclear, com presença de núcleos com cromatina condensada (Prancha 8-fig. 8.5) e uma maior quantidade de mitocôndrias e grânulos de secreção degenerados (Prancha 8-fig. 8.6).

Após 48 horas, o aspecto geral apresentava-se mais organizado, observando-se a presença de degeneração citoplasmática e vacuolização apenas em algumas regiões (Prancha 9-fig. 9.1). Nota-se ainda a presença de grande quantidade de grânulos de secreção íntegros e a presença de retículo endoplasmático granular extensivo (Prancha 9-fig. 9.2), o que denota um maior poder de síntese, parecendo estar em processo de reparação. Estes achados são semelhantes ao encontrado no grupo sem proteção, após 72 horas da irradiação.

A presença do retículo endoplasmático extensivo fica mais evidente no tempo após 72 horas (Prancha 9-fig. 9.3), estando associado à grande quantidade de mitocôndrias (Prancha 9-fig. 9.4), demonstrando uma alta atividade celular. Nota-se também que o aspecto geral é bem mais preservado (Prancha 9-fig. 9.5), estando muito próximo da normalidade, porém ainda são encontradas pequenas áreas de alteração citoplasmáticas (Prancha 9-fig. 9.6). Esses achados podem indicar que a medida em que o selenito de sódio foi sendo eliminado os danos foram se tornando menores, permitindo assim uma reparação do tecido glandular.

Os resultados verificados no grupo onde foi realizada somente a administração do selenito de sódio permitem concluir também que o radioprotetor avaliado provoca alterações celulares, sendo evidentes a partir da 8ª hora, com seu máximo de alteração após 24 horas, sendo semelhante aos achados de LU *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1995; LU *et al.*, 1995; SPYROU *et al.*, 1995; STEWART *et al.*, 1999. Porém em todos os tempos avaliados, o grau de alteração tecidual apresentou-se bem menor em relação aos grupos irradiados, o que indica que o risco-benefício desta substância é favorável, visto que a radiação acomete consideravelmente um maior grau de destruição quando aplicada sem o uso do radioprotetor.

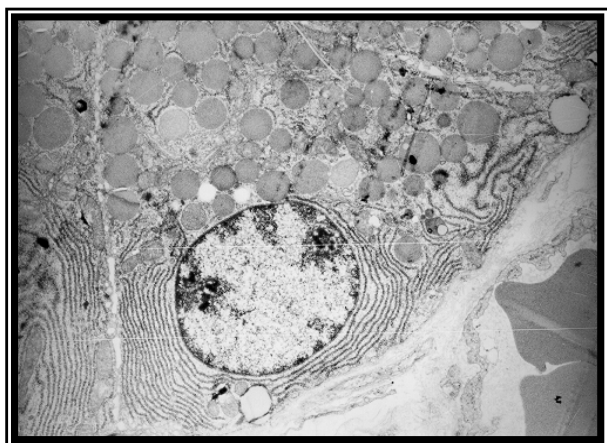
Diante dos resultados obtidos neste estudo, ficaram evidentes as alterações ultra-estruturais nas glândulas salivares decorrentes do uso da radiação, o que se torna de fundamental importância à procura de meios que possam amenizar seus efeitos deletérios. Estas alterações estruturais determinam uma série de prejuízos para a qualidade de vida dos pacientes que são submetidos a este tipo de tratamento, como redução no fluxo salivar (xerostomia), aumento do índice de cáries e infecções bucais, disfagia, mucosites, desconforto noturno, enfim, alterações estas que se tem tentado reduzir através de diversos estudos com substâncias capazes de diminuir estes efeitos adversos. Estas substâncias apresentam diversos mecanismos de atuação, mas com uma única finalidade: a radioproteção. Sendo assim, neste estudo procurou-se encontrar uma forma de amenizar os efeitos deletérios provocados pela radiação ionizante nas glândulas parótidas, através do uso do radioprotetor selenito de sódio, avaliando as

alterações ultra-estruturais que ocorrem na fase aguda após uma alta dose de radiação de  $^{60}\text{Co}$  (15 Gy), verificando, assim, a eficácia deste radioprotetor, que mesmo apresentando um certo grau de toxicidade, mostrou um risco-benefício favorável para o seu uso.

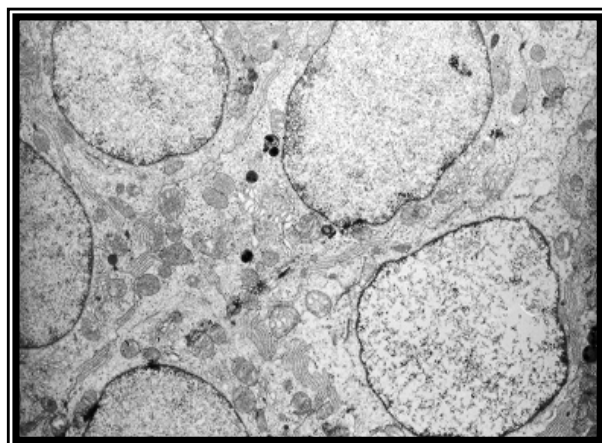


6. *PRANCHAS*

**PRANCHA 01 - Eletromicroscopia de Transmissão**  
**GRUPO CONTROLE**

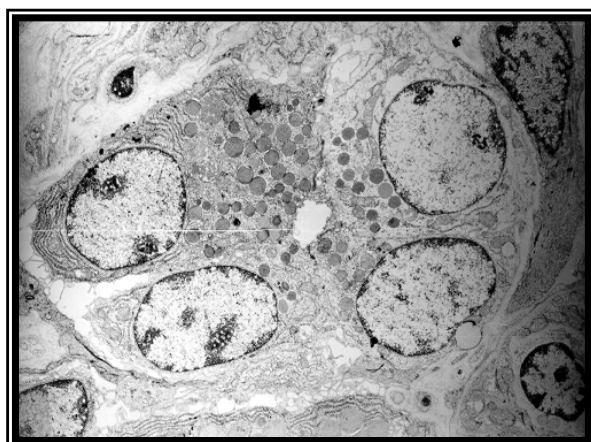


**Fig. 1.1 – Aspecto Normal do Grupo Controle**  
**Aumento: 3.150 X**

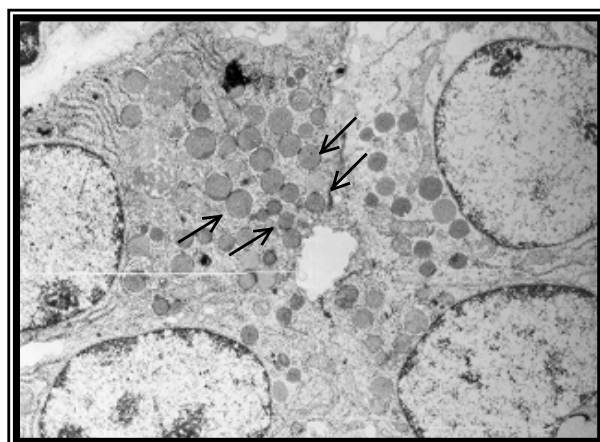


**Fig. 1.2 – Núcleos e Citoplasma do Grupo Controle**

**Aumento: 5.000 X**

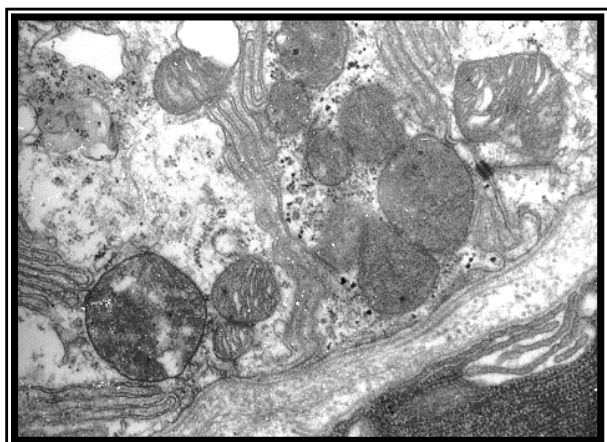


**Fig. 1.3 – Células Acinares do Grupo Controle**  
**Aumento: 6.300 X**



**Fig. 1.4 – Detalhe dos Grânulos de Secreção do Grupo Controle**

**Aumento: 6.300 X**

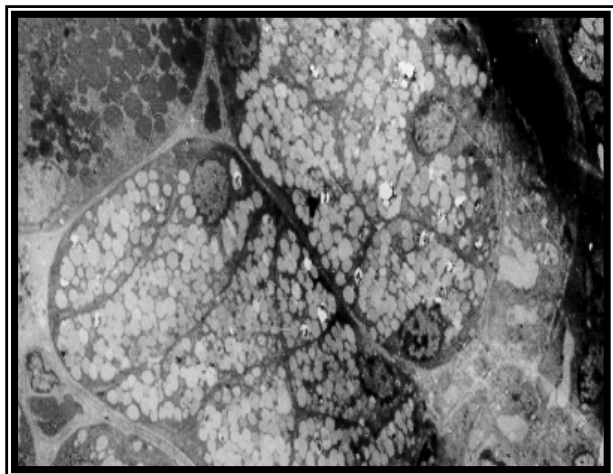


**Fig. 1.5 – Citoplasma do Grupo Controle**  
**Aumento: 8.000 X**



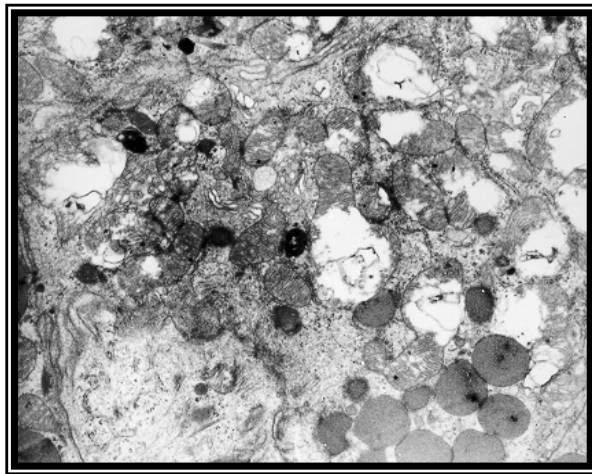
**Fig. 1.6 – Núcleo do Grupo Controle**  
**Aumento: 8.000 X**

**PRANCHA 02 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
**GRUPO IRRADIADO**



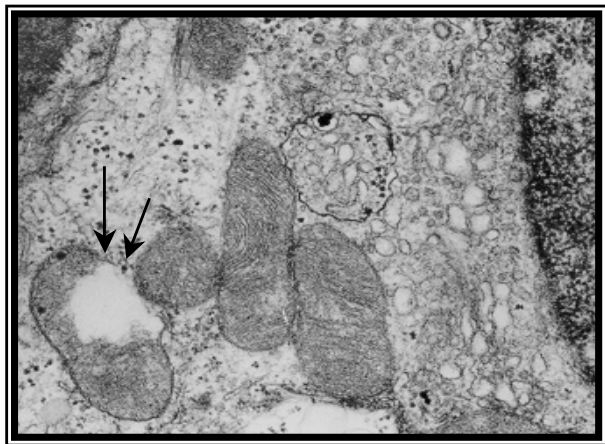
**Fig. 2.1 – Aspecto Geral do Grupo Irradiado 4 horas pós-radiação**

**Aumento: 2.500 X**



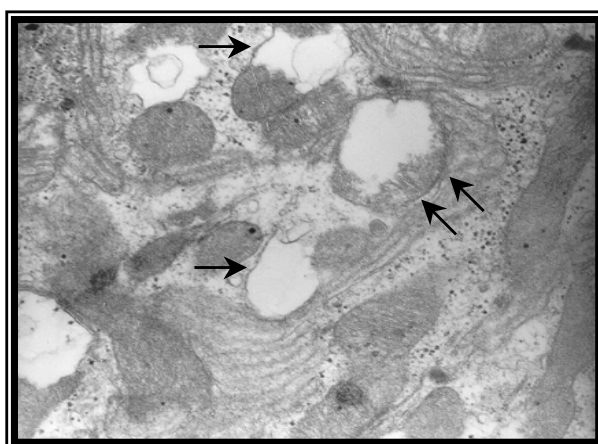
**Fig. 2.2 – Degeneração dos Grânulos de Secreção após 4 horas da Irradiação**

**Aumento: 6.300 X**



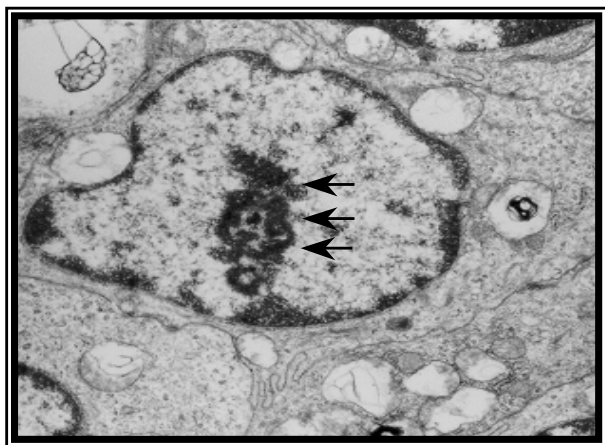
**Fig. 2.3 – Degeneração de Mitocôndrias (4 horas pós-radiação)**

**Aumento: 25.000 X**



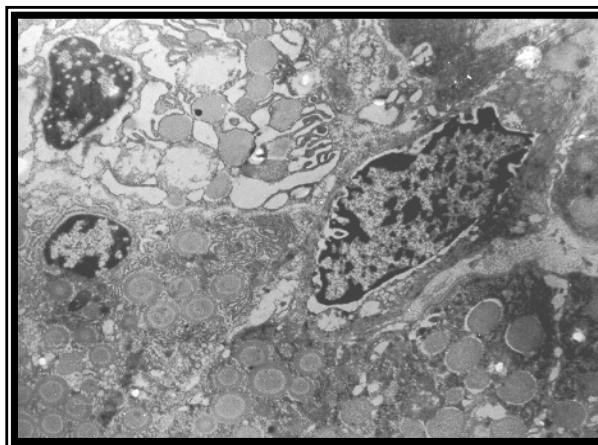
**Fig. 2.4 – Vesículas Citoplasmáticas (4 horas pós-radiação)**

**Aumento: 20.000 X**



**Fig. 2.5 – Núcleo com Cromatina Condensada (4 horas pós-radiação)**

**Aumento: 10.000 X**



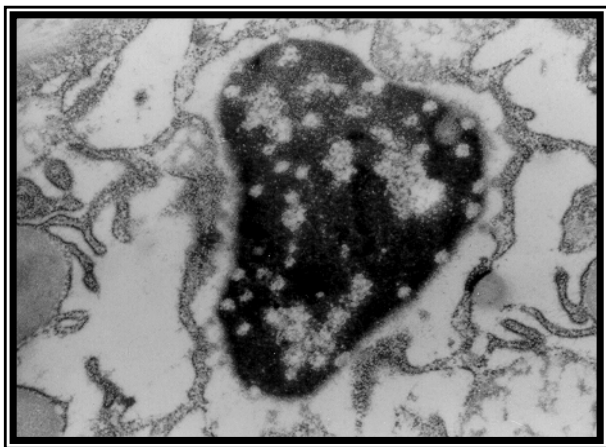
**Fig. 2.6 – Aspecto Geral do Grupo Irradiado após 8 horas da Irradiação**

**Aumento: 6.300 X**



**PRANCHA 03 - Fotomicroscopia de Transmissão**

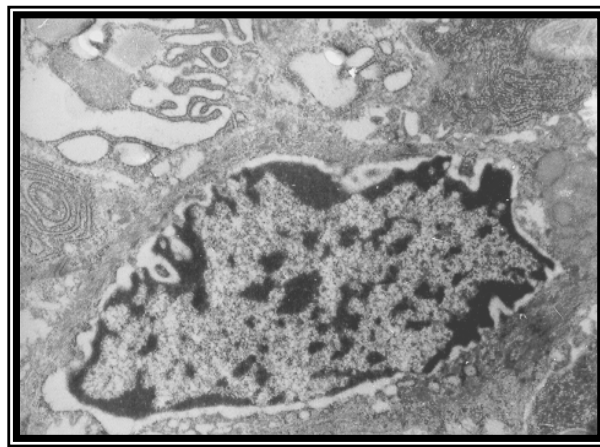
***GRUPO IRRADIADO***



**Fig. 3.1 – Núcleo com Características de Apoptose**

*(8 horas pós-irradiação)*

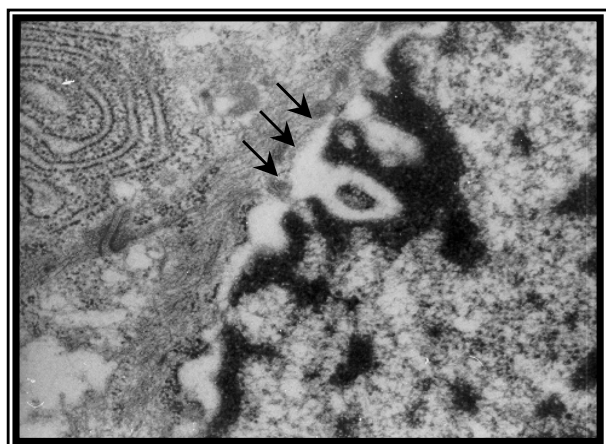
**Aumento: 20.000 X**



**Fig. 3.2 – Condensação de Cromatina**

*(8 horas pós-irradiação)*

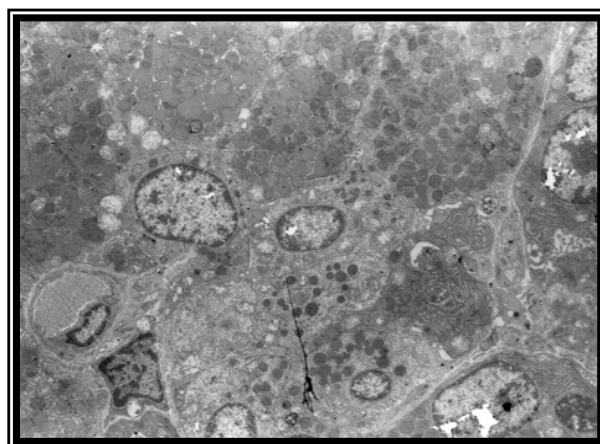
**Aumento: 12.500 X**



**Fig. 3.3 – Aumento do Espaço do Envelope Nuclear**

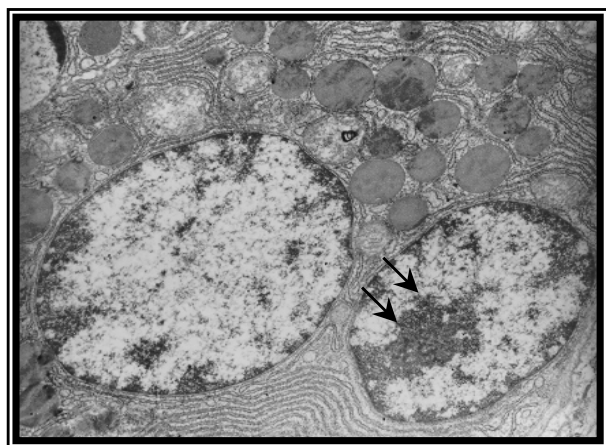
*(8 horas pós-irradiação)*

**Aumento: 31.500 X**



**Fig. 3.4 – Aspecto Geral do Grupo Irradiado após 24 horas da Irradiação**

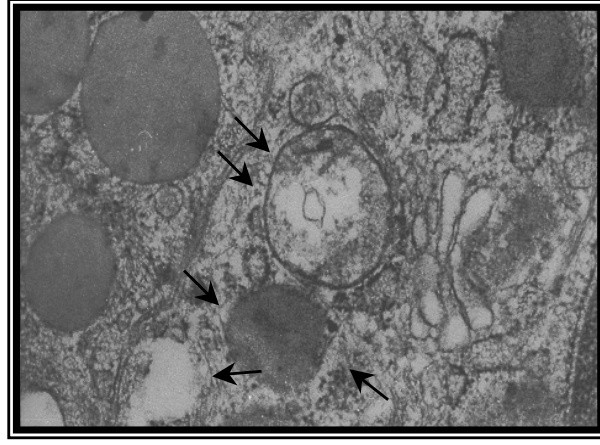
**Aumento: 2.500 X**



**Fig. 3.5 – Cromatina Nuclear Condensada**

*(24 horas pós-irradiação)*

**Aumento: 8.000 X**



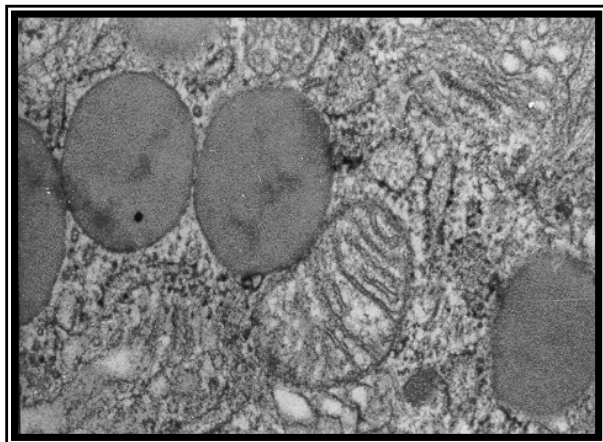
**Fig. 3.6 – Alteração em Organelas Citoplasmáticas**

*(24 horas pós-irradiação)*

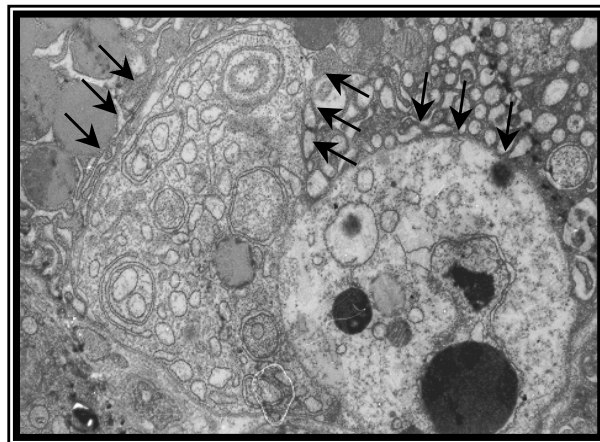
**Aumento: 40.000 X**



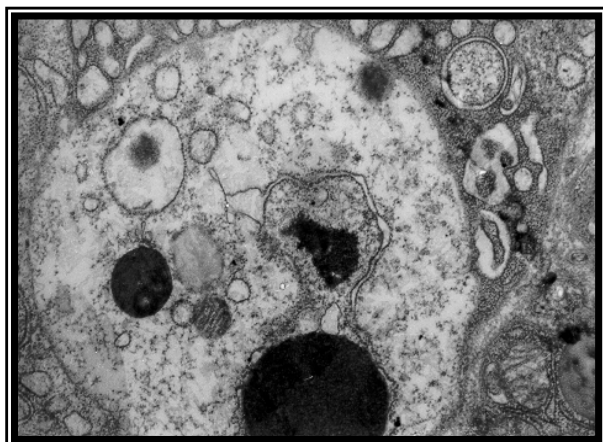
**PRANCHA 04 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
**GRUPO IRRADIADO**



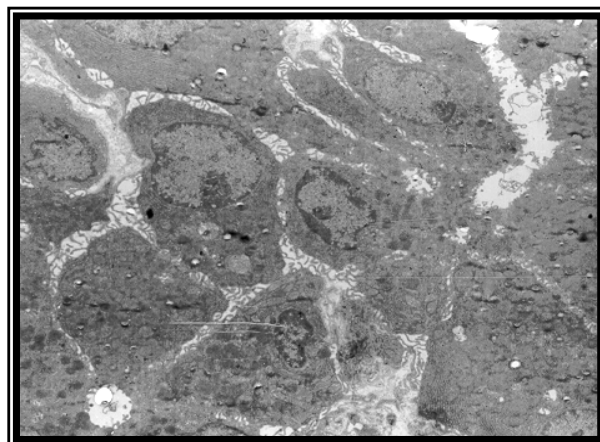
**Fig. 4.1 – Organelas com Padrão de Normalidade**  
**(24 horas pós-irradiação)**  
**Aumento: 50.000 X**



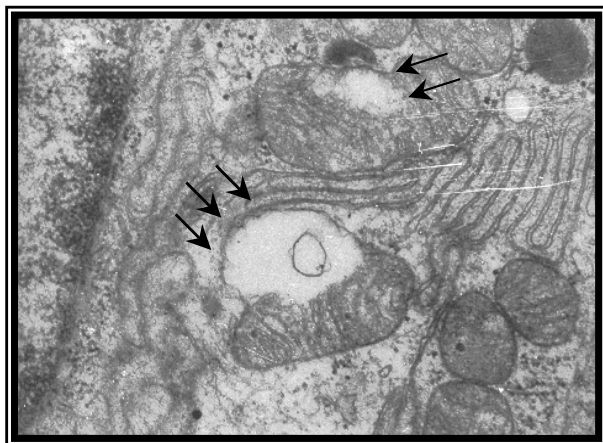
**Fig. 4.2 – Degeneração Citoplasmática**  
**(24 horas pós-irradiação)**  
**Aumento: 10.000 X**



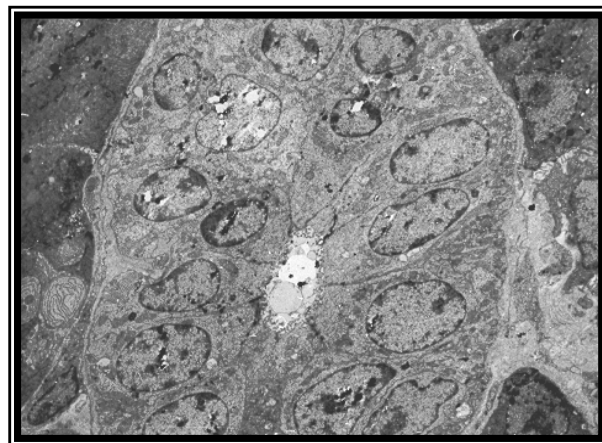
**Fig. 4.3 – Detalhe da Região Anterior**  
**(24 horas pós-irradiação)**  
**Aumento: 16.000 X**



**Fig. 4.4 – Aspecto Geral das Células Acinares**  
**(48 horas pós-irradiação)**  
**Aumento: 3.150 X**



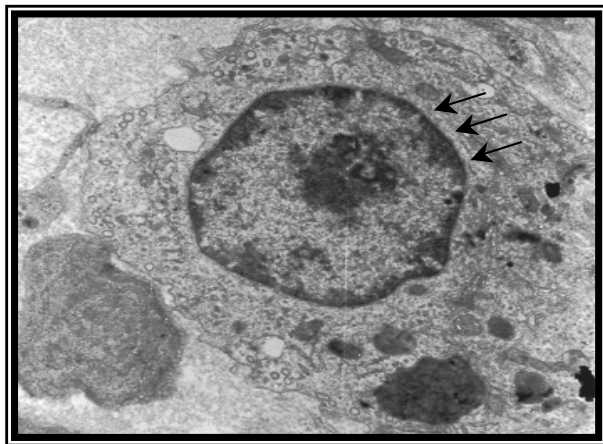
**Fig. 4.5 – Mitocôndrias Dilatadas e Destruídas (48 horas pós-irradiação)**  
**Aumento: 31.500 X**



**Fig. 4.6 – Aspecto Geral do Ducto Glandular**  
**após 48 horas da Irradiação**  
**Aumento: 2.500 X**

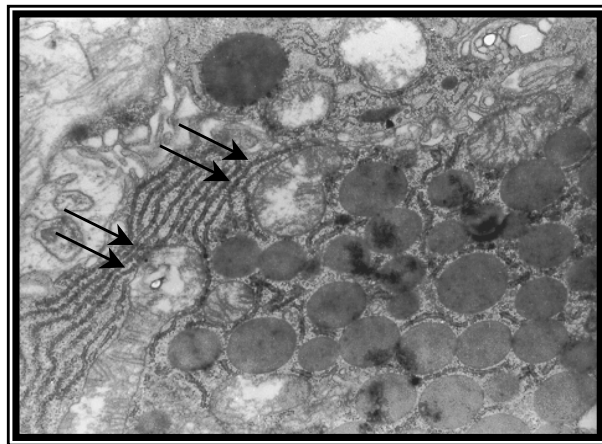
**PRANCHA 05 - Fotomicroscopia de Transmissão**

***GRUPO IRRADIADO***



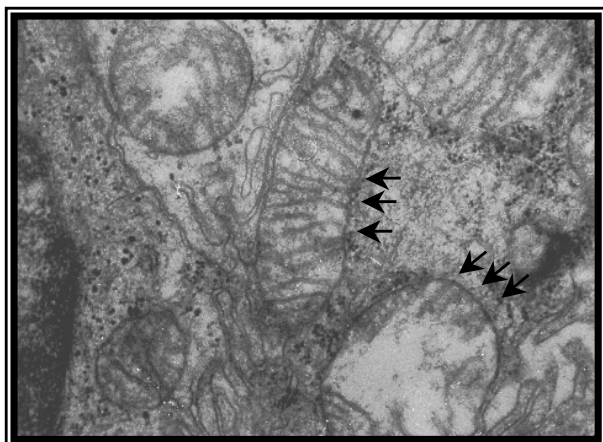
**Fig. 5.1 – Núcleo com Cromatina Condensada**  
(48 horas pós-irradiação)

**Aumento: 8.000 X**



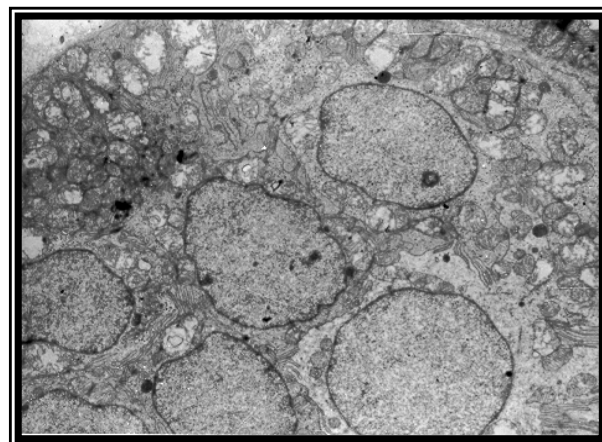
**Fig. 5.2 – Mitocôndrias Destruidas**  
(72 horas pós-irradiação)

**Aumento: 12.500 X**



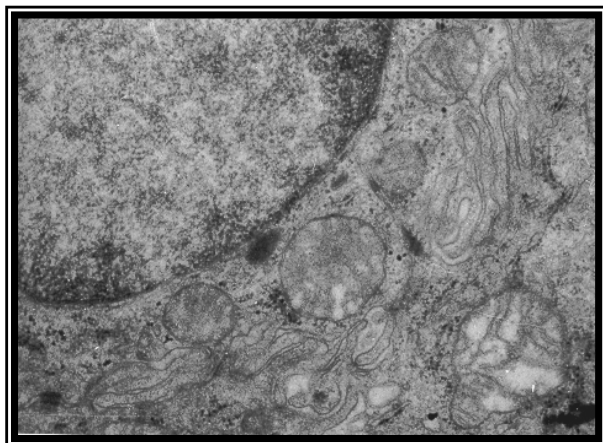
**Fig. 5.3 – Mitocôndrias Preservadas e Destruidas (72 horas pós-irradiação)**

**Aumento: 31.500 X**



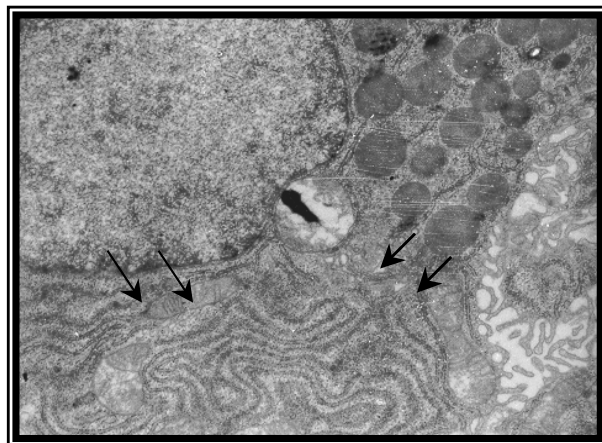
**Fig. 5.4 – Núcleos com Aspecto de Normalidade**  
(72 horas pós-irradiação)

**Aumento: 5.000 X**



**Fig. 5.5 – Grande Quantidade de Mitocôndrias**  
(72 horas pós-irradiação)

**Aumento: 25.000 X**

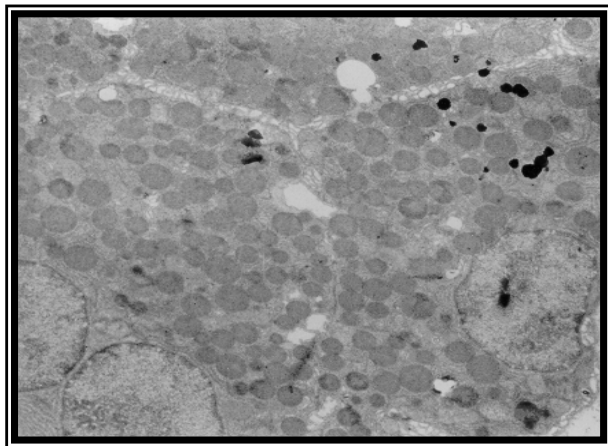


**Fig. 5.6 – Retículo Endoplasmático Granular Extensivo (72 horas pós-irradiação)**

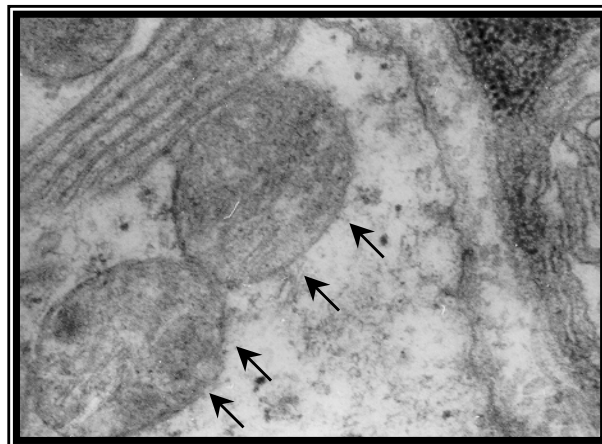
**Aumento: 12.500 X**

---

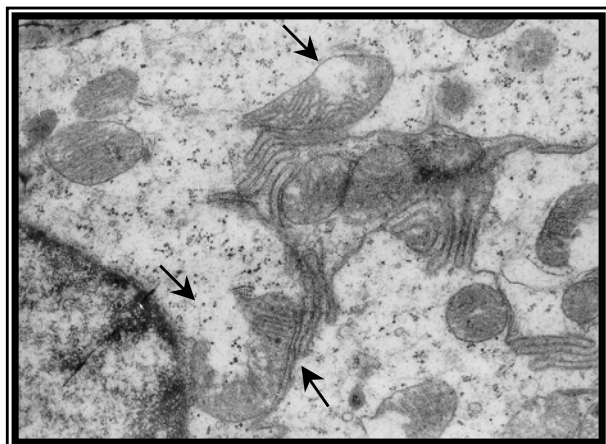
**PRANCHA 06 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
***GRUPO SELÊNIO-IRRADIADO***



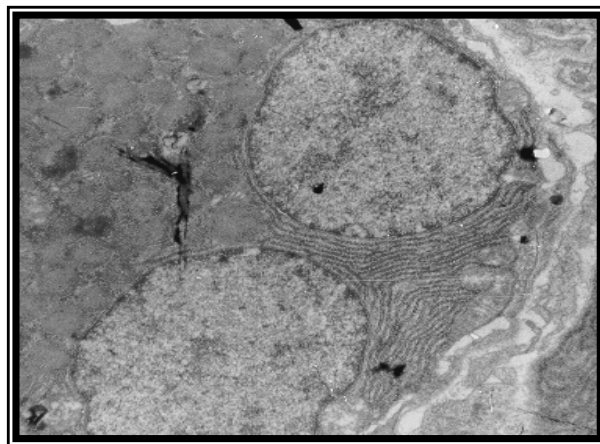
**Fig. 6.1 – Grânulos de Secreção Preservados**  
(4 horas pós-irradiação/selênio)  
Aumento: 5.000 X



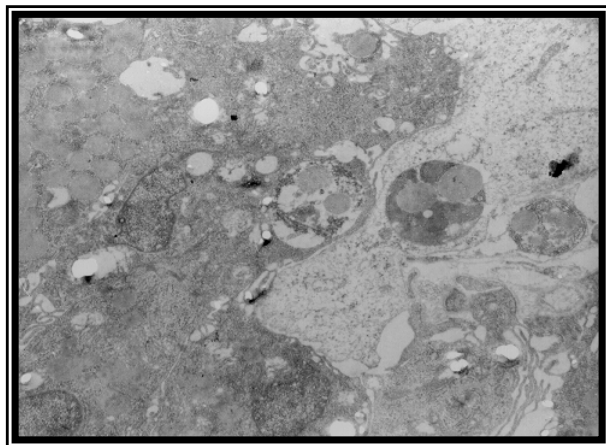
**Fig. 6.2 – Mitocôndrias Preservadas**  
(4 horas pós-irradiação/selênio)  
Aumento: 50.000 X



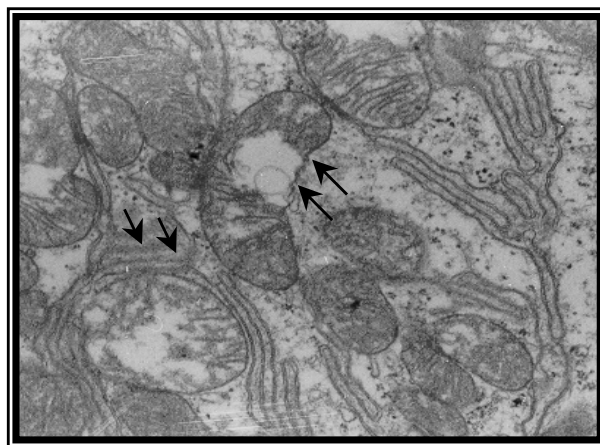
**Fig. 6.3 – Mitocôndrias Destruídas**  
(4 horas pós-irradiação/selênio)  
Aumento: 16.000 X



**Fig. 6.4 – Núcleos com Padrões de Normalidade**  
(4 horas pós-irradiação/selênio)  
Aumento: 6.300 X

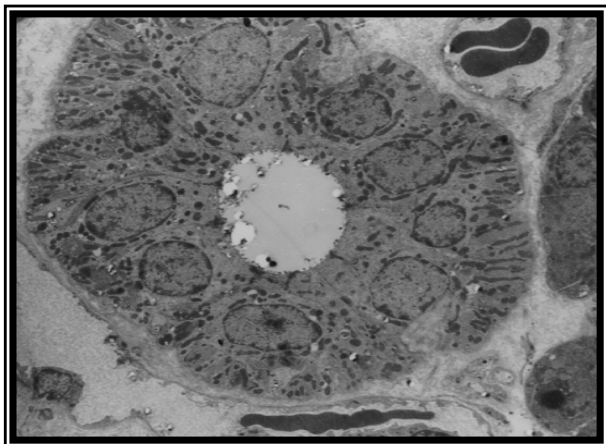


**Fig. 6.5 –Aspecto Geral com Degeneração**  
**Citoplasmática 8 horas pós-irradiação/selênio**  
Aumento: 6.300 X



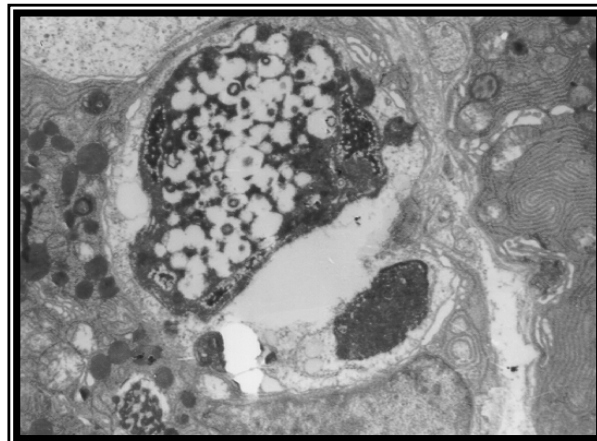
**Fig. 6.6 – Mitocôndrias com Degeneração (8 horas**  
**pós-irradiação/selênio)**  
Aumento: 20.000 X

**PRANCHA 07 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
***GRUPO SELÊNIO-IRRADIADO***



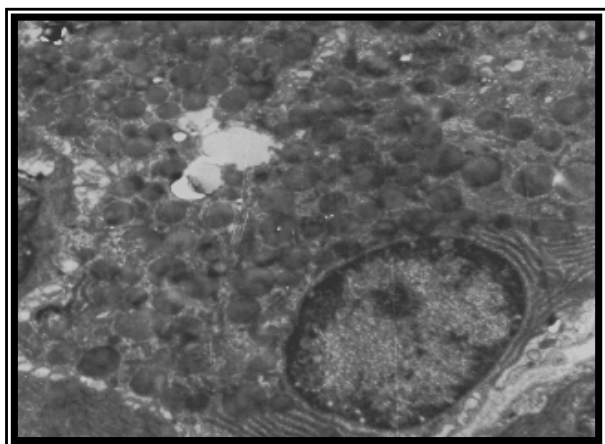
**Fig. 7.1 – Aspecto Geral do Ducto Glândular (24 horas pós-irradiação/selênio)**

**Aumento: 3.150 X**



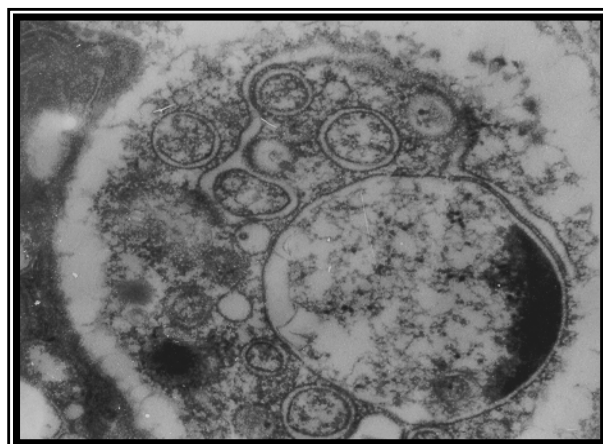
**Fig. 7.2 – Presença de “Corpo Citolítico”  
(24 horas pós-irradiação/selênio)**

**Aumento: 6.300 X**



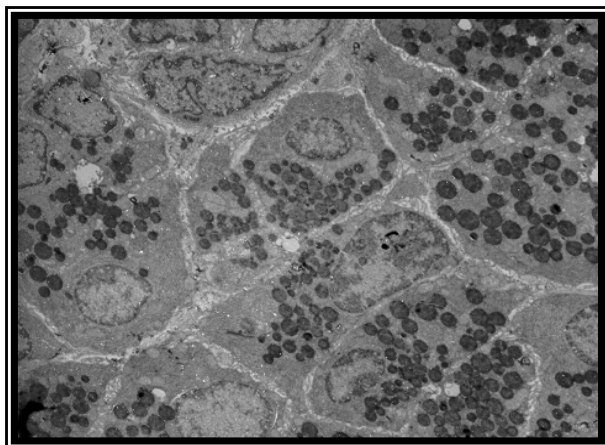
**Fig. 7.3 – Aspecto Geral após 48 Horas da Radioproteção com o Selênio**

**Aumento: 6.300 X**



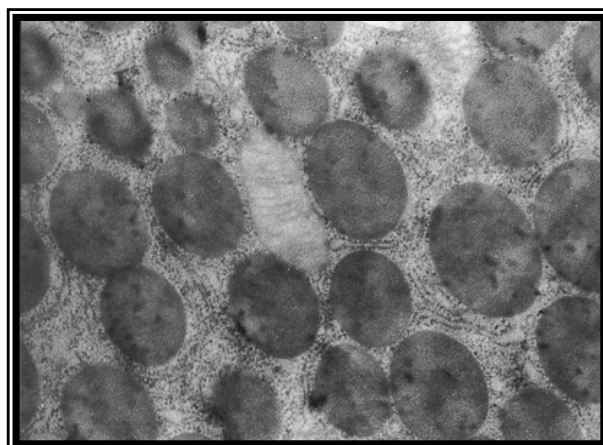
**Fig. 7.4 – Presença de “Corpo Citolítico”  
(48 horas pós-irradiação/selênio)**

**Aumento: 10.000 X**



**Fig. 7.5 – Aspecto Geral Após 72 Horas de Radioproteção**

**Aumento: 3.150 X**

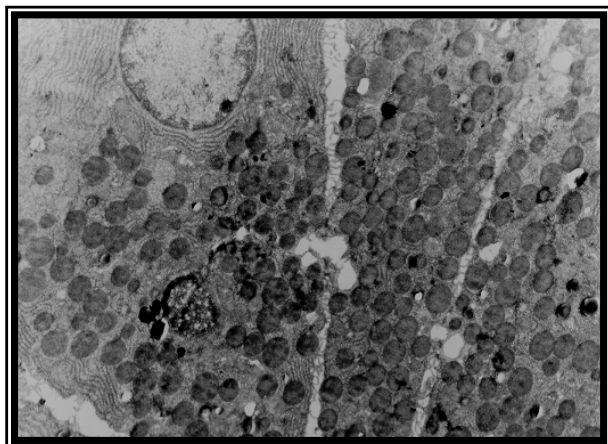


**Fig. 7.6 – Organelas Citoplasmáticas Preservadas  
(72 horas pós-irradiação/selênio)**

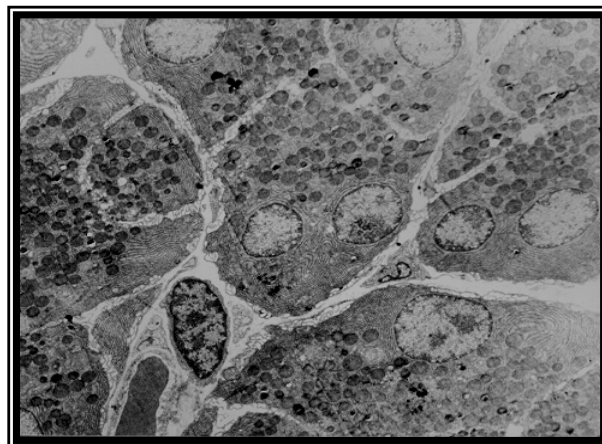
**Aumento: 25.000 X**



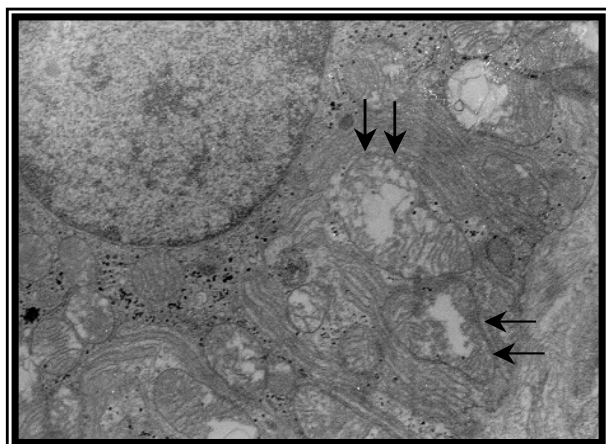
**PRANCHA 08 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
***GRUPO SELÊNIO***



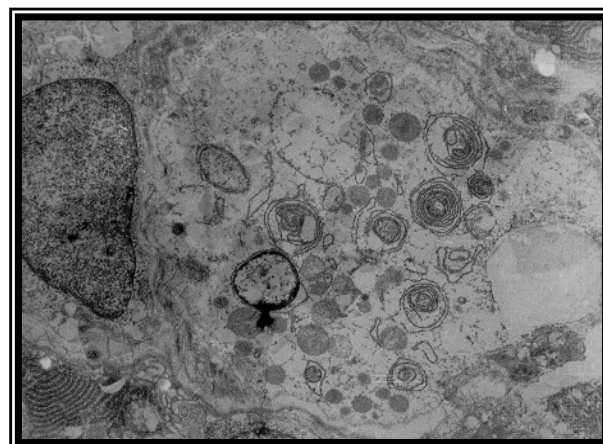
**Fig. 8.1 – Aspecto Geral Preservado**  
(4 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 5.000 X



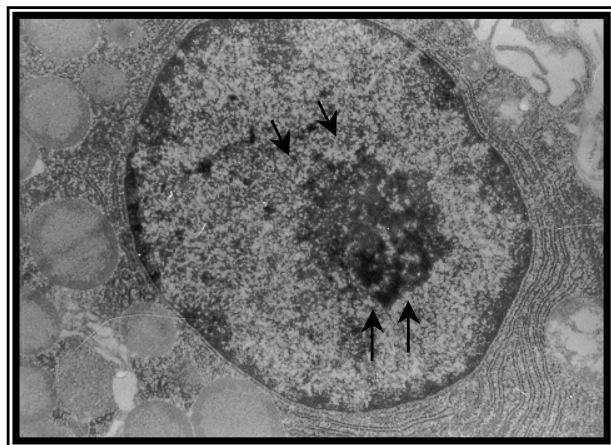
**Fig. 8.2 – Núcleos e Citoplasma Normais**  
(4 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 2.500 X



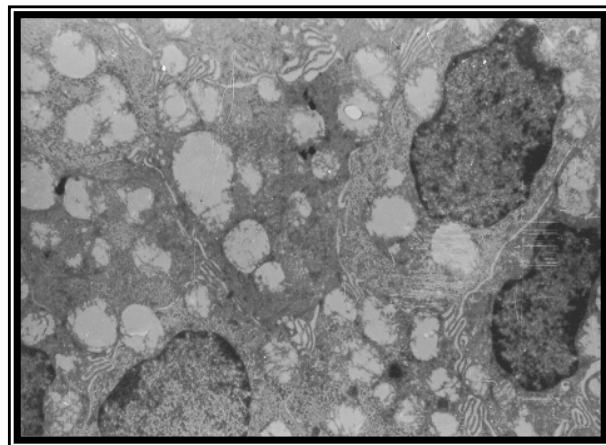
**Fig. 8.3 – Degeneração de Organelas**  
(8 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 12.500 X



**Fig. 8.4 – Presença de “Corpos Citolíticos”**  
(8 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 6.300 X

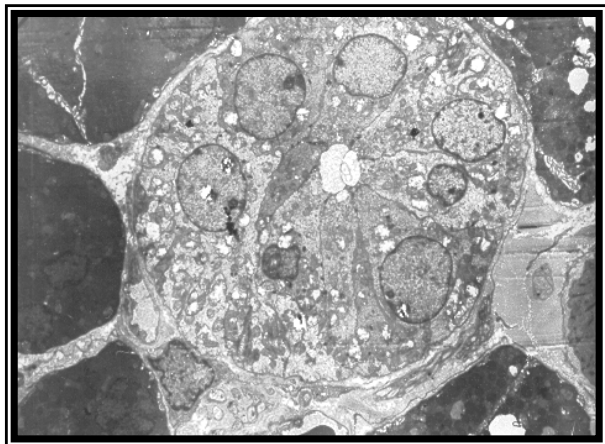


**Fig. 8.5 – Núcleo com Cromatina Condensada**  
(24 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 12.500 X

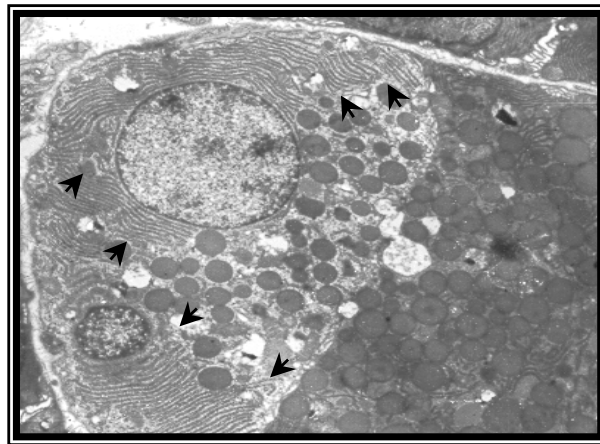


**Fig. 8.6 – Organelas em Processo de Degeneração**  
(24 horas do Grupo Selênio)  
Aumento: 6.300 X

**PRANCHA 09 - Fotomicroscopia de Transmissão**  
***GRUPO SELÊNIO***



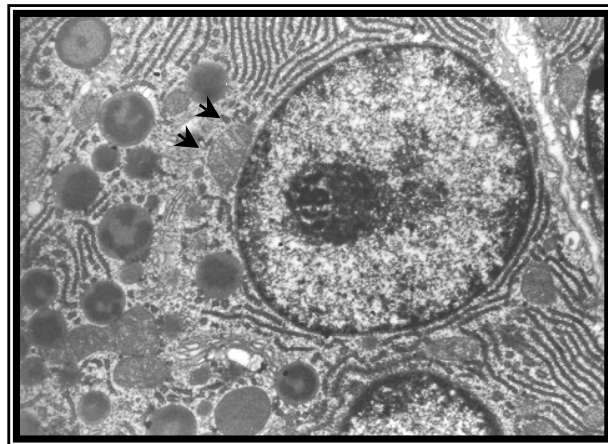
**Fig. 9.1 – Vacuolização Citoplasmática**  
**(48 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 2.000 X**



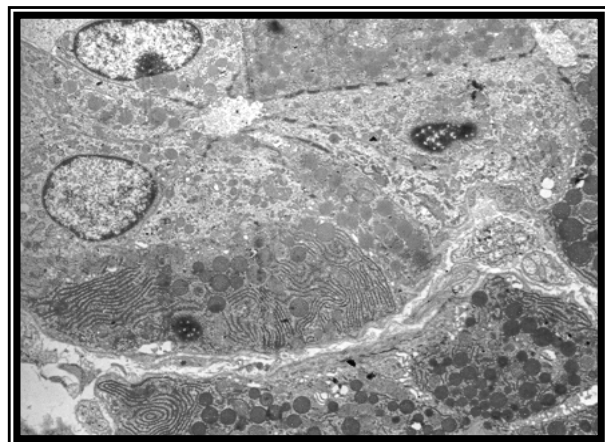
**Fig. 9.2 – Retículo Endoplasmático Extensivo**  
**(48 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 4.000 X**



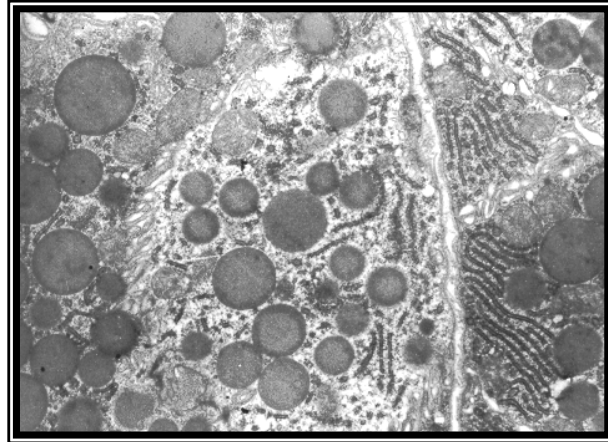
**Fig. 9.3 – Retículo Endoplasmático Extensivo**  
**(72 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 8.000 X**



**Fig. 9.4 – Mitocôndrias Perinuclear**  
**(72 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 10.000 X**



**Fig. 9.5 – Aspecto Geral Preservado**  
**(72 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 3.150 X**



**Fig. 9.6 – Alteração Citoplasmática**  
**(72 horas do Grupo Selênio)**  
**Aumento: 10.000 X**

## 7. CONCLUSÕES

**A** partir dos resultados obtidos no presente estudo, dentro das condições experimentais utilizadas, as seguintes conclusões foram obtidas:

- I.** A irradiação causou alterações nas células acinares das glândulas parótidas, observando-se que as estruturas citoplasmáticas foram mais prejudicadas que as nucleares;
- II.** Apesar de serem observadas alterações no grupo selênio/irradiado, porém bem menos significantes que no grupo irradiado, o selenito de sódio apresentou-se como um radioprotetor eficaz, amenizando as alterações ultra-estruturais em todos os grupos analisados;
- III.** O selenito de sódio apresentou uma certa toxicidade, com presença de alterações celulares. Uma vez que estas alterações foram menores do que aquelas causadas pela radiação, o risco-benefício do uso do selenito de sódio é favorável para a radioproteção em glândulas salivares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 1 Anderson MW, Izutsu KT, Rice JC. Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients. **Oral Surg.** 1981; 52 (5): 495-500.
- 2 Asami K, Furuno I. Inhibition by X-rays of isoproterenol-induce increase in cAMP content in parotid glands is not due to direct action on the plasma membranes. **Int J. Radiat. Biol.** 1981; 39 (6): 665-69.
- 3 Bohuslavizki KH, Klutmann S, Jenicke L, Brenner W, Feyerabend B, Henze E, Clausen M. Radioprotection of salivary glands by S-2-(3-Aminopropylamino)-Ethylphosphorothioic (Amifostine) obtained in a rabbit animal model. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 1999; 45 (1): 181-86.
- 4 Borek C, Ong A, Mason H, Donahue L, Biaglow JE. Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanism. **Proc Natl Acad Sci.** 1986; 83: 1490-94.
- 5 Borek C. Molecular Mechanisms in Cancer Induction and Prevention. **Env. Healt. Perspect. Suppl.** 1993; 101: 237-45.
- 6 Breccia A, Badiello R, Trenta A, Mattii M. On the Chemical Radioprotection by Organic Selenium Compounds in Vivo. **Radiation Research.** 1969; 38: 483-92.
- 7 Burgess KL, Dardick I. Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.** 1998; 85: 699-706.
- 8 Chow CK, Tappel AL. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. **J Nutr.** 1974; 104: 444-51.

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



- 9 Coppes RP, Zeilstra LJ, Kampinga HH, Konings AW. Early to late aparing of radiation damage to the parotid gland by adrenergic and muscarinic receptor agonists. **British Journal of Cancer**. 2001; 85 (7): 1055-63.
- 10 Coppes RP, Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW. Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. **Radiation Research**. 1997; 148: 240-47.
- 11 Coppes RP, Vissink A, Konings AWT. Comparison of radiosensivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. **Radiotherapy and Oncology**. 2002; 63: 321-328.
- 12 Ellenhorn MJ, Barceloux DG. **Medical toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier, 1988.
- 13 Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Lett**. 1973; 32 (1): 132-34.
- 14 Grehn AL, Gustafsson H, Franzen L, Thornell LE, Henriksson R. Ultrastructural morphometry of parotid acinar cells following fractionated irradiation. **Oral Oncology**. 1997; 33 (1): 23-28.
- 15 Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J Nutr**. 1974; 104: 580-587.
- 16 Hall HD. Role of isoproterenol in radioprotection against acute changes in the rat parotid gland. **Jornal of Oral Surgery**. 1974; 32: 665-70.
- 17 HOLLÓ, Z.M. et al. The prevention of x-ray death by selenium salts given after irradiation. **Naturwissenschaften**. 1960; 47: 328.
- 18 Hurt HD, Cary EE, Allaway WH, Visek WJ. Efect of dietary selenium on the survival of rats exposed to chronic whole body irradiation. **J Nutr**. 1971; 101: 363-66.
- 19 Kumar KS, Vaishnav YN, Weiss JF Radioprotection by antioxidant enzymes and enzyme mimetics. **Pharmacol Ther**. 1988; 39 (1-3): 301-09.
- 20 Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**. 1976; 71 (4): 952-58.
- 21 Leccia MT, Richard MJ, Beani JC, Faure H, Monjo AM, Cadet J, Amblard P, Favier A. Protective effect of selenium and zinc on uv-a damage in human skin fibroblasts. **Photochem Photobiol**. 1993; 58 (4): 548-53.
- 22 Lu J, Jiang C, Kaeck M, Ganther H, Vadhanavikit S, Ip C, Thompson H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium.

- Biochemical Pharmacology.** 1995; 50 (2): 213-219.
- 23 Lu J, Kaeck M, Jiang C, Wilson AC, Thompson HJ. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. **Biochemical Pharmacology.** 1994; 47(9): 1531-35.
- 24 Messelt EB, Dahl E. Influence of x-ray irradiation on the ultrastructure of rat submandibular glands striated-duct cells. **Acta Odontol. Scand.** 1983; 41 (5): 277-82.
- 25 Nagler R, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induce damage to the salivary glands: the role of redox-active iron and copper. **Radiation Research.** 1997; 147 (4): 468-75.
- 26 Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. A 2 week pair-fed study of early X-irradiation effects on rat major salivary gland function. **Pergamon.** 1996; 41 (7): 713-17.
- 27 Nagler RM, Reznick AZ, Slavin S, Nagler A. Partial protection of rat parotid glands from irradiation-induced hyposalivation by manganese superoxide dismutase. **Archives of Oral Biology.** 2000; 45 (9): 741-47.
- 28 Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of X radiation on the finction of rat salivary glands. **Radiation Research.** 1993; 136: 42-47.
- 29 Nagler RM, Dov Laufer. Protection against irradiation-induce damage to salivary glands by adrenergic agonist administration. **Int. J. Radiation Biol. Phys.** 1998; 40 (2): 477-81.
- 30 Parise Júnior. O. **Câncer de Boca: aspectos básicos e terapêuticos.** 1.ed. São Paulo: Sarvier, 2000.
- 31 Peter B, Van Waarde MA, Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Konings AW. Radiation-induced cell proliferation in the parotid and submandibular glands of the rat. **Radiation Research.** 1994a; 140 (2): 257-65.
- 32 Peter B, Van Waarde MA, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AW. The role of secretory granules in the radiosensitivity of rat salivary gland acini – a morfological study. **Radiation Research.** 1994b; 140 (3): 419-28.
- 33 Pratt NE, Sodicoff M. Ultrastructural injury following x-irradiation of rat parotid gland acinar cells. **Archs. Oral. Biol.** 1972; 17 (8): 1177-86.
- 34 Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter JA, Howie AF, Arthur JR, Nicol F *et al.* Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochem.**

**Journal.** 1998; 332 (Pt-1): 231-36.

- 35 Reade PC, Steidler NE. X-irradiation induced degranulation of cells of convoluted granular tubules of murine submandibular salivary glands. **Jour. Biol. Buccale.** 1985; 13: 307-13.
- 36 Roesink JM, Konings AW, Terhaard CH, Battermann JJ, Kampinga HH, Coppes RP. Preservation of the rat parotid gland function after radiation by prophylactic prilocarpine treatment: radiation dose dependency and compensatory mechanism. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 1999; 45 (2): 483-89.
- 37 Roslindo, E.B. et al. Estudo histomorfológico da glândula parótida de rato jovem submetida à radiação ionizante. **Rev. Odont. Unesp.** 1989; 18: 131-42.
- 38 Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Hoekstra WG. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. **J Nutr.** 1972; 102 (5): 689-96.
- 39 Sandstrom BE, Carlsson J, Marklund SL. Selenite-induce variation in glutathione peroxidase activity of three mammalian cell lines: no effect on radiation-induced cell killing or dna strand breakage. **Radiat Res.** 1989; 117 (2): 318-25.
- 40 Sandstrom BE, Grankvist K, Marklund SL. Selenite-induced increase in glutathione peroxidase activity protects human cells from hydrogen peroxide-induce DNA damage, but not from damage inflicted by ionizing radiation. **Int J Radiat Biol.** 1989; 56 (5): 837-41.
- 41 Sholley MM, Sodicoff M, Pratt NE. Early radiation injury in the rat parotid gland – reaction of acinar cells and vascular endothelium. **Laboratory Investigation.** 1974; 31 (4): 340-54.
- 42 Sodicoff M, Conger AD, Pratt NE, Trepper P. Radioprotection by WR-2721 against long-term chronic damage to the rat parotid gland. **Radiation Research.** 1978; 76 (1): 172-79.
- 43 Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by cAMP. **Radiation Research.** 1983a; 96: 90-94.
- 44 Sodicoff M, Conger AD. Radioprotection of the rat parotid gland by WR-2721 and Isoproterenol and its modification by Propranolol. **Radiation Research.** 1983b; 96: 97-104.
- 45 Spyrou G, Bjornstedt M, Kumar S, Holmgren A. AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione. **FEBS Letters.** 1995; 368 (1): 59-63.

- 46 Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LJ. Response of parotid gland organ culture to radiation. **Radiation Research**. 1989; 120 (1): 140-53.
- 47 Stern MH, Turner JE, Jett LS, Mincer H, McGinnis. Electron microscopic changes in rat parotid and submandibular glands subsequent to total body irradiation with fast neutrons. **Oral Surgery**. 1976; 42 (5): 620-30.
- 48 Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**. 1999; 26(1-2): 42-48.
- 49 Tappel AL. Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. **Fed Proc**. 1965; 24: 73-78.
- 50 Vissink A, Kalicharan D, S-Gravenmade EJ, Jongebloed WL, Ligeon EE, Nieuwenhuis P et al. Acute irradiation effects on morphology and function of rat submandibular glands. **J. Oral Pathol. Med**. 1991; 20(9): 449-56.
- 51 Weiss JF, Hoover RL, Kumar KS. Selenium pretreatment enhances the radioprotective effect and reduces the letal toxicity of wr-2721. **Free Radic Res Commun**. 1987; 3 (1-5): 33-38.
- 52 Wu L, Lanfear J, Harrison PR. The selenium metabolite selenodiglutathione induce cell death by a mechanism distinct from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity. **Carcinogenesis**. 1995; 16 (7): 1579-84.